

Studio della produzione di poliidrossialcanoati da siero di latte

Original

Studio della produzione di poliidrossialcanoati da siero di latte / Carletto, RICCARDO ANDREA. - (2014).
[10.6092/polito/porto/2564341]

Availability:

This version is available at: 11583/2564341 since:

Publisher:

Politecnico di Torino

Published

DOI:10.6092/polito/porto/2564341

Terms of use:

Altro tipo di accesso

This article is made available under terms and conditions as specified in the corresponding bibliographic description in the repository

Publisher copyright

(Article begins on next page)

POLITECNICO DI TORINO

SCUOLA DI DOTTORATO

Dottorato in Ingegneria Chimica – XXV ciclo

Tesi di Dottorato

**Studio della produzione di Polioidrossialcanoati
da siero di latte**



Riccardo Andrea Carletto

Tutori

prof. Luca Marmo

prof.ssa Francesca Bosco

Coordinatore del corso di dottorato

prof. Vito Specchia

GENNAIO 2014

“Aut viam inveniam aut faciam”

Seneca, Hercules Furens

INDICE

Introduzione.....	4
1. Il mercato delle materie plastiche.....	4
1.1 Le plastiche tradizionali derivate dal petrolio.....	4
1.2 Le plastiche bio-based e le bioplastiche	7
1.3 Produzione industriale dei PHA.....	8
2. I PHA e la produzione per via microbica	10
2.1 Struttura e caratteristiche.....	10
2.2 Proprietà del PHB e del PHBV: confronto con il polipropilene.....	11
2.3 Biodegradabilità.....	12
2.4 Applicazioni.....	12
2.5 Biosintesi.....	13
2.6 Substrati economici per la produzione di PHA.....	14
2.6.1 Scarti cellulosici derivanti da coltivazioni cerealicole.....	14
2.6.2 Melasso.....	15
2.6.3 Oli vegetali.....	15
2.6.4 Acque reflue.....	15
2.6.5 Metanolo.....	16
2.6.6 Sottoprodotti dell'industria casearia.....	16
3. L'industria casearia.....	17
3.1 Volumi di produzione.....	17
3.2 Processi di produzione.....	18
3.3 I sottoprodotti: siero di latte, scotta, latticello.....	20
4. Pretrattamento dei sottoprodotti dell'industria casearia per la produzione di PHA.....	23
4.1 Precipitazione termocalcica.....	23
4.2 Ultrafiltrazione.....	24
5. Produzione di PHA da siero di latte.....	27
5.1 Fermentazione con <i>Hydrogenophaga pseudoflava</i>	27
5.2 Fermentazione con <i>rEscherichia coli</i>	28
5.3 Fermentazione con <i>Thermus thermophilus</i>	30
5.4 Fermentazione con <i>Methylobacterium</i> ZP 24.....	31
6. Estrazione dei PHA.....	33
6.1 Processi di pretrattamento.....	33
6.2 Estrazione con solvente.....	33
6.3 Estrazione con ipoclorito di sodio.....	34
6.4 Estrazione con ipoclorito di sodio e cloroformio.....	34
6.5 Purificazione.....	35
7. Scopo del lavoro.....	37
8. Materiali e Metodi.....	38
8.1 Terreni di coltura.....	39
8.2 Terreno <i>Khardenavis</i> con fonte di carbonio acido acetico.....	39

8.3		
8.4	Siero di latte commerciale Molkolac®, addizionato dei sali del terreno <i>Khardenavis</i>	40
8.5	Siero di latte e scotta	40
8.6	Pretrattamenti di scotta e siero di latte	42
8.6.1	Precipitazione termocalcica	42
8.6.2	Microfiltrazione	42
8.6.3	Ultrafiltrazione	43
8.7	Allestimento delle fermentazioni	45
8.7.1	Allestimento delle colture in beuta	45
8.7.2	Allestimento delle colture in reattore	45
8.8	Determinazione della biomassa: densità ottica, peso secco	46
8.8.1	Densità ottica	46
8.8.2	Peso secco	46
8.9	Determinazione del consumo dei nutrienti e dei prodotti extracellulari di fermentazione (HPLC)	47
8.10	Determinazione dell'ammonio con kit enzimatico	48
8.11	Determinazione dei microrganismi PHA produttori mediante colorazione con Sudan Black B	48
8.11.1	Inoculo della biomassa su terreno solido Agar Malto	48
8.11.2	Colorazione con Sudan Black B	49
8.12	Estrazione dei poliidrossialcanoati	49
8.12.1	Estrazione secondo il metodo ipoclorito-cloroformio	49
8.12.2	Estrazione secondo il metodo 1,2-propilen carbonato	50
8.13	Caratterizzazione dei PHA	51
8.13.1	Digestione acida dei PHA: spettrofotometria UV ed HPLC	51
8.13.2	Analisi FT-IR	52
9.	Risultati e Discussione	53
9.1	Fermentazioni con terreno sintetico	53
9.1.1	Fermentazioni senza controllo di temperatura e pH	53
9.1.2	Fermentazioni con controllo di temperatura, pH e concentrazione di lattosio 20 g/l	55
9.1.3	Confronto tra le fermentazioni NC e C20	56
9.1.4	Fermentazioni con controllo di temperatura, pH e concentrazione di lattosio 40 g/l	58
9.1.5	Confronto tra le fermentazioni C20 e C40	60
9.2	Fermentazioni con scotta e siero di latte	61
9.2.1	Fermentazioni con permeato di scotta e correzione del rapporto C/N	62
9.2.2	Confronto tra le fermentazioni C 40 e Scotta CN 50	64
9.2.3	Fermentazione con permeato di siero di toma e correzione del rapporto C/N	66
9.2.4	Confronto tra le fermentazioni Scotta CN 50 e Toma CN 50	67
9.2.5	Fermentazione con permeato di scotta senza correzione del rapporto C/N	69
9.2.6	Confronto tra le fermentazioni Scotta CN TQ e Scotta CN 50	70
9.2.7	Fermentazione con scotta non pretrattata	72
9.2.8	Confronto tra le fermentazioni Scotta CN TQ e Scotta NT	74
9.2.9	Fermentazione con scotta non pretrattata fed-batch	76

9.2.10	Confronto tra le fermentazioni Scotta NT e Scotta FB.....	78
9.3	Fermentazioni condotte su scala pilota.....	80
9.3.1	Scale-up del processo.....	81
9.3.2	Prova idraulica.....	81
9.3.3	Primo test di fermentazione: modalità batch.....	82
9.3.4	Secondo test di fermentazione: modalità fed-batch.....	84
9.3.5	Confronto tra le fermentazioni Pilota 1 e Pilota 2.....	86
9.3.6	Criticità dello scale-up in impianto pilota.....	87
10.	Analisi effettuate sui campioni di polimero estratto.....	89
10.1	Analisi FT-IR.....	89
10.2	Determinazione dei prodotti di degradazione ottenuti mediante digestione acida dei campioni di polimero.....	93
11.	Confronto con i dati di letteratura.....	94
12.	La produzione di PHA integrata in un processo di bioraffineria.....	96
13.	Conclusioni.....	98
	Bibliografia.....	99

INTRODUZIONE

1. Il mercato delle materie plastiche

1.1 Le plastiche tradizionali derivate dal petrolio

Fin dal lontano 1950 le materie plastiche costituiscono una storia di successo a livello globale.

La produzione industriale, su scala globale [1,2], è continuata a crescere per oltre 50 anni, da 1.5 milioni di tonnellate nel 1950, fino a 288 milioni di tonnellate nel 2012, con una crescita media annua del 9 % fino al 2007 (figura 1.1). La recente crisi economica, ha influito duramente sulla crescita della produzione annuale di materie plastiche, determinandone un consistente calo a livello mondiale: si è passati da 260 milioni di tonnellate prodotte nel 2007 a 245 nel 2008; anche a livello europeo la crisi si è fatta sentire, infatti, si è passati da 65 milioni di tonnellate prodotte nel 2007 a 60 milioni di tonnellate nel 2008.

Mentre la produzione su scala globale risulta essere in lenta ripresa (+ 2.8 % nel 2012 rispetto al 2011), in Europa risulta essere ancora in calo (- 3 % nel 2012 rispetto al 2011) [1].

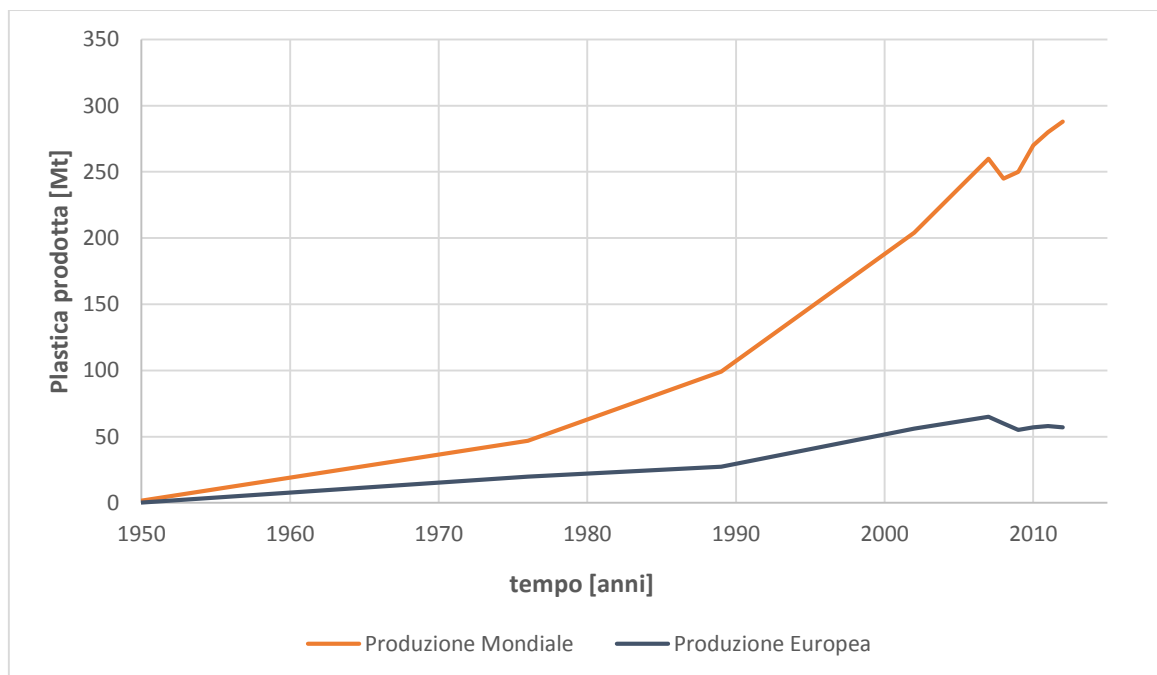


Figura 1.1: produzione di materie plastiche nel mondo dal 1950 al 2012 [1].

In questo panorama occorre osservare come l'area a maggior potenziale di crescita siano i paesi asiatici in via di sviluppo (escluso il Giappone) dove il consumo corrente pro-capite plastica si aggira intorno ai 20 kg/anno.

La Cina rimane il produttore leader a livello mondiale con il 24 % del mercato (figura 1.2), mentre l'Europa raggiunge il 20 % della produzione globale eguagliando i paesi facenti parte del "North American Free Trade Agreement" (NAFTA), cioè Stati Uniti, Canada e Messico.

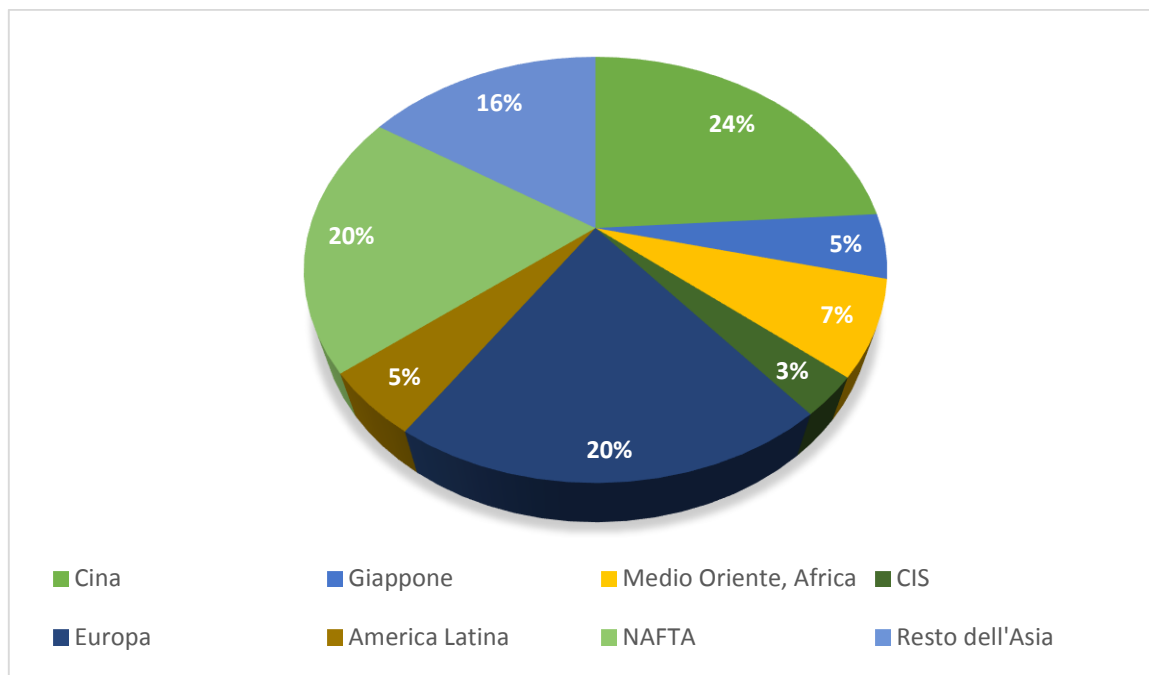


Figura 1.2: produzione mondiale di materie plastiche nel 2012, (CIS: Commonwealth of Independent States; NAFTA: North American Free Trade Agreement).

Il packaging risulta essere il settore di mercato che riveste il maggior consumo di materie plastiche con il 39 %, seguito da abitazioni e costruzioni con il 20 % e l'8 % del settore automotive (figura 1.3), mentre una consistente quota del 23 %, include i settori come l'arredamento, lo sport, la salute e la sicurezza.

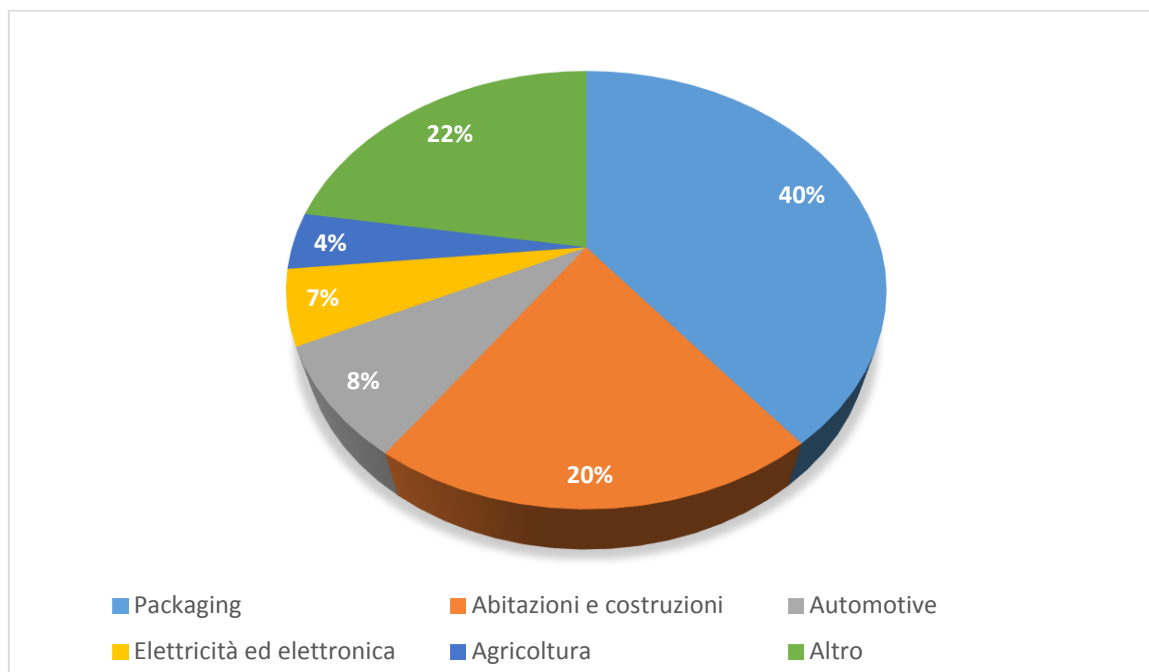


Figura 1.3: domanda europea di materie plastiche nel 2012 suddivisa per settori (EU 27+Norvegia e Svizzera) [1].

L'ingente quantitativo di materie plastiche prodotte a livello globale, presenta problemi di natura ambientale legati alle opzioni di fine vita di questi materiali. Negli ultimi anni sono aumentati gli

sforzi da parte dei paesi produttori, ed in particolare dell'Europa, nel potenziare le forme di riciclo, come alternativa, rispetto allo smaltimento in discarica, considerando anche il valore di mercato residuo, rappresentato dalle materie plastiche destinabili al riciclaggio.

Nel 2009 l'Unione Europea destinava allo smaltimento in discarica il 46 % della plastica prodotta, contro il 38.1 % del 2012, mentre al riciclo era destinato il 22.5 % contro il 26.3 % del 2012 e la valorizzazione energetica mediante combustione ammontava al 31.5 % contro il 35.6 % del 2012 [1]. Quest'ultima forma di valorizzazione se da un lato potrebbe rappresentare una risposta alla crescente domanda energetica, costituisce un potenziale pericolo legato alle emissioni di gas serra (CO₂) determinate dalla combustione di carbonio organico riconducibile ad origini fossili.

Negli ultimi anni, la disponibilità sempre più limitata dei carburanti fossili, l'aumento del prezzo del petrolio, i cambiamenti climatici in atto e la sensibilizzazione della coscienza ambientale delle popolazioni stanno influenzando le politiche dei governi, le industrie e la scienza, a cercare alternative al petrolio ed ai suoi derivati. Ad oggi l'85-90 % delle plastiche prodotte è di origine petrolchimica [1], tuttavia le plastiche bio-based e le bioplastiche stanno conquistando sempre maggiori quote di mercato.

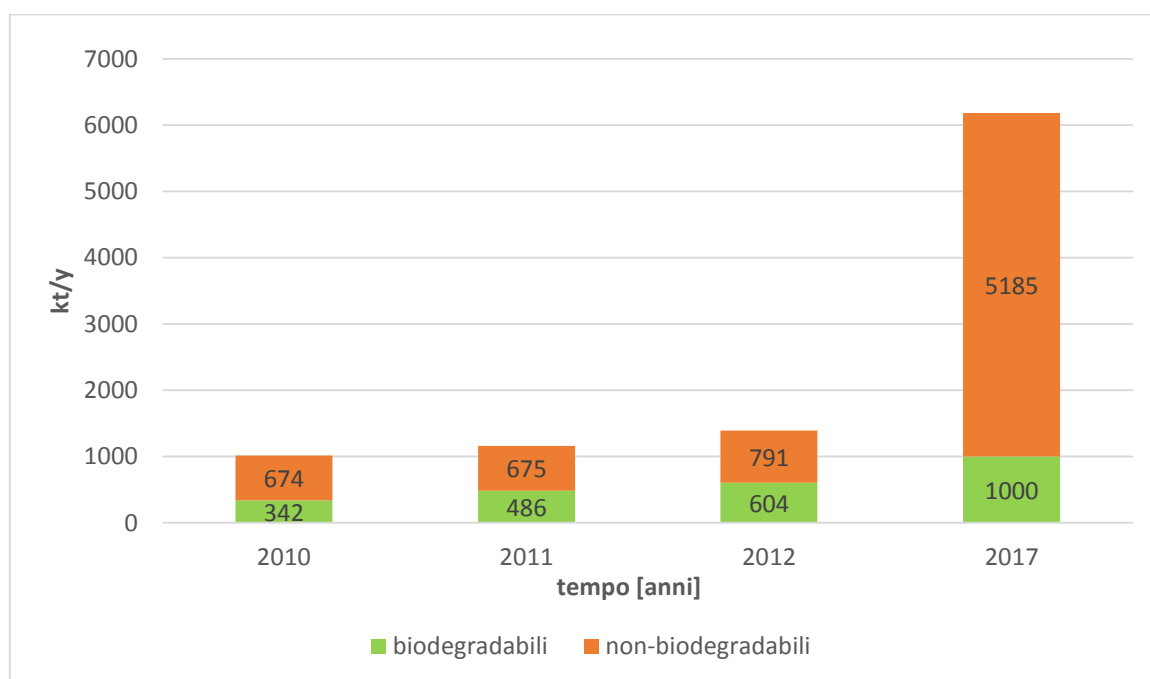


Figura 1.4: capacità produttiva Europea di plastiche bio-based e bioplastiche [3].

La domanda crescente di soluzioni alternative alle plastiche tradizionali, maggiormente sostenibili dal punto di vista ambientale, si riflette nella crescita della capacità produttiva delle bioplastiche [3]: nel 2012 questa capacità ammonta, in Europa, a 1.4 milioni di tonnellate (figura 1.4), le attuali previsioni di mercato indicano che nel 2017 questa aumenterà fino ad oltre 6 milioni di tonnellate.

Le plastiche bio-based e le bioplastiche costituiscono ormai una categoria di materiali efficienti e tecnologicamente maturi; sono in grado di migliorare il bilancio tra i benefici derivanti dall'uso e dal loro impatto ambientale. Le analisi LCA, inoltre, dimostrano che questi materiali possono ridurre significativamente le emissioni di CO₂ rispetto alle plastiche tradizionali derivate dal petrolio, sfruttando altresì fonti rinnovabili e maggiormente disponibili [3].

1.2 Le plastiche bio-based e le bioplastiche

Per plastiche bio-based si intendono quei materiali o prodotti, biodegradabili e non, sintetizzati impiegando monomeri bio-derivati; possono essere ottenute attraverso due vie principali [3]:

- Utilizzando polimeri naturali (biopolimeri) che possono essere in parte modificati (ad esempio le plastiche prodotte a partire dall'amido come il Mater-Bi®).
- Sintetizzando monomeri bio-based attraverso processi di fermentazione (come nel caso dell'acido lattico) o sintesi chimica tradizionale (chimica del C₁) e polimerizzando questi monomeri in un secondo passaggio.

Non tutte le plastiche bio-based risultano biodegradabili, è il caso, per esempio, del bioPET, del bioPE e del bioPP, che possiedono caratteristiche analoghe a quelle ottenute utilizzando monomeri di derivazione petrolchimica ma sono costituite da monomeri di origine biologica, il vantaggio di questi materiali è senza dubbio quello di poter essere ottenuti a partire da fonti rinnovabili.

Con il termine bioplastiche, invece, sono definiti quei materiali ottenibili essenzialmente a partire da biopolimeri derivanti da sintesi microbica: è il caso dei poliidrossialcanoati (PHA) sintetizzati sia da microrganismi di tipo "wild type" (presenti in natura), sia da microrganismi ingegnerizzati.

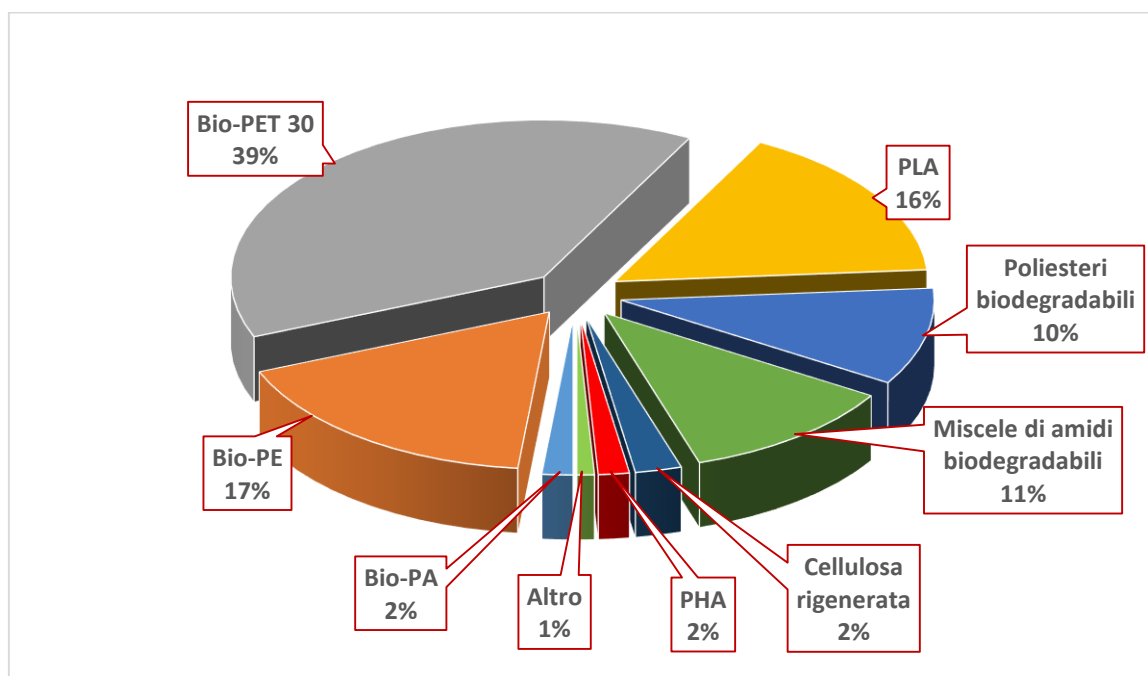


Figura 2.1: produzione Europea di plastiche bio-based e bioplastiche nell'anno 2011, per un ammontare di 1161 kt complessive [3].

La diffusione dei PHA, tuttavia, risulta ancora piuttosto limitata [3] se confrontata alle plastiche di tipo bio-based ed al PLA (figura 2.1), infatti la produzione di PHA in Europa nell'anno 2011 ammonta al 2 % del totale, mentre quella del PLA è pari al 16 % e quella del bio-PET 30 è del 39 %. Questo fatto è dovuto soprattutto ai costi di produzione elevati dei PHA, determinati da un processo di produzione articolato su più fasi che necessita, a valle della fermentazione microbica, di una estrazione del polimero dalla biomassa e di una purificazione, necessarie a causa della natura intracellulare di questo biopolimero.

Allo scopo di ridurre i costi di produzione si possono adottare diverse strategie:

- Impiegare microrganismi ingegnerizzati che consentano il raggiungimento di rese e produttività più elevate rispetto ai normali ceppi puri, tuttavia questa scelta necessita di controlli stringenti dal punto di vista della sterilità delle operazioni di fermentazione e di down-stream, per evitare

la contaminazione delle colture, e necessita di severi controlli degli ambienti di lavoro onde evitare contaminazioni da parte di questi microrganismi. Da ciò derivano costi di gestione elevati che comportano una notevole riduzione dei benefici derivanti dalla maggiore produttività dei processi ed il non trascurabile rischio di contaminazione ambientale.

- Impiegare consorzi microbici presenti naturalmente nell'ambiente e non pericolosi, in grado di sopravvivere e sintetizzare i PHA, senza necessitare di operazioni condotte in sterilità.
- Impiegare terreni di coltura a basso costo, costituiti da scarti, il cui utilizzo comporta il doppio vantaggio di essere economici e di contribuire alla riduzione dei costi di smaltimento degli scarti stessi.

In questo contesto si inserisce il lavoro di tesi condotto, che sfruttando le ultime due strategie presentate, cioè impiegando un consorzio microbico costituito da fanghi attivi di caseificio e sottoprodotti dell'industria casearia come il siero di latte e la scotta, mira all'ottenimento dei PHA con un processo di produzione sostenibile.

1.3 Produzione industriale dei PHA

La maggior parte dei produttori di PHA attualmente sul mercato, sono aziende di dimensioni contenute, con capacità produttive ridotte, intorno alle 1.000-20.000 t y⁻¹, che non possono contare sull'economia di scala, come ad esempio accade nel caso di unità di produzione del polietilene di potenzialità pari a 300.000 t y⁻¹. I principali produttori di PHA a livello mondiale e le relative capacità produttive sono riepilogati in tabella 1.1.

Il primo brevetto depositato riguardante la produzione di PHA, risale al 1959, quando la W.R. Grace & Co. di New York iniziò a produrre il PHB a scopo commerciale, tuttavia la compagnia chiuse dopo poco tempo, a causa della ridotta efficienza di produzione ed alla mancanza di un idoneo processo di purificazione.

Nel 1970 la ICI iniziò a commercializzare il copolimero PHBV, sotto il nome commerciale di Biopol® [5]; nel 1996 la tecnologia di produzione fu venduta a Monsanto ed in seguito a MetaboliX.

L'azienda Procter & Gamble in collaborazione con Kaneka Corporation, l'Università Cinese di Tsingta ed il Riken Institute Giapponese svilupparono un ampio spettro di applicazioni del PHB e del PHBV (Nodax®) sotto forma di fibre, tessuto non tessuto, dispersioni acquose e prodotti usa e getta, tuttavia la tecnologia Nodax® fu venduta nel 1993 e nel 2006 la partnership tra Procter & Gamble e Kaneka Corporation venne interrotta [6].

Recentemente la Kaneka Corporation, presso la città di Takasago in Giappone, ha iniziato la produzione del copolimero PHBH di origine vegetale, con capacità produttiva dichiarata di 10.000 t y⁻¹. Sempre in Giappone la Mitsubishi Gas Chemical produce PHB attraverso la fermentazione del metanolo con il nome commerciale di BioGreen®.

L'azienda tedesca Biomer Inc. produce PHB per applicazioni speciali su scala commerciale. Nel 1993 questa azienda acquistò la tecnologia ed i ceppi microbici dalla ditta Austriaca Petrochemia Danubia, registrando il marchio commerciale Biomer® nel 1995.

In Brasile, uno dei maggiori produttori mondiali di canna da zucchero, la PHB Industrial S.A. impiega lo zucchero di canna per produrre il PHB, con il nome commerciale di Biocycle®, grazie ad una joint venture con il produttore di zucchero Irmaoes Biagi ed il produttore di etanolo Balbo Group; la compagnia possiede un impianto pilota da 50 t y⁻¹ e sta pianificando di costruire un impianto produttivo della capacità di 3.000 t y⁻¹ [7].

L'azienda Tianan Biological Material con sede in Ningbo, China è il primo produttore mondiale di PHBV [8], la sua capacità produttiva attuale è di circa 10.000 t y⁻¹, il suo prodotto, l'Enmat® viene prodotto sotto forma di polvere, pellet e film, oppure commercializzato in blend con l'EcoFlex.

La Tianjin Green BioSciences a seguito di un consistente investimento di DSM nel 2008, è in grado di produrre 10.000 t y⁻¹ del suo prodotto, il PHBH commercializzato con il nome “GreenBio” ed attualmente sta investendo per produrre PHA destinati al mercato delle applicazioni biomediche [8].

Tabella 3.11: principali produttori di PHA a livello mondiale [8, 9].

Polimero	Nome Commerciale	Produttore	Substrato	Capacità t y⁻¹	Prezzo €/kg
PHB	<i>Biogreen</i> [®]	Mitsubishi Gas Chem. Comp. Inc. (Japan)	Metanolo	10.000	2.5-3.0
PHB	<i>Mirel</i> [®]	Telles (US)	Zuccheri da lavorazione del mais	50.000	1.50
PHB	<i>Biocycle</i> [®]	PHB Industrial Company (Brazil)	Melasso	50	n/a
PHBV e PHB	<i>Biomer</i> [®]	Biomer Inc. (Germany)	Saccarosio, siero di latte idrolizzato	50	3.0-5.0
PHBV PHBV + Ecoflex	<i>Enmat</i> [®]	Tianan Biologic Ningbo (China)	Zuccheri da lavorazione del mais	10.000	3.26
PHBH	<i>Nodax</i> [®]	P&G	-	20.000-50.000	2.50
PHBH	<i>Nodax</i> [®]	Lianyi Biotech (China)	-	2.000	3.70
PHBH	<i>Kaneka PHBH</i>	Kaneka Corp. (Japan)	Scarti da produzione olio vegetale	1.000	n/a
P(3HB-co-4HB)	<i>Green Bio</i>	Tianjin Green Bio-Science Co/DSM	Zuccheri (non specificato)	10.000	n/a
PHA from P&G	<i>Meredian</i>	Meredian (US)	-	272.000 (2013)	n/a

2. I PHA e la produzione per via microbica

2.1 Struttura e caratteristiche

I PHA sono poliesteri alifatici sintetizzati per via fermentativa da fonti rinnovabili. Essi si accumulano sotto forma di granuli nel citoplasma delle cellule batteriche quando subentrano condizioni di limitazione di alcuni macronutrienti (N, P, S) nel terreno di coltura. La loro funzione risulta essere di riserva di carbonio e di potere riducente [10].

Oltre 90 generi di batteri sono in grado di sintetizzare questi biopolimeri, tra cui in particolare si ricordano: *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Rhodospirillum*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes/Ralstonia*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Acinetobacter* e *Corynebacterium*.

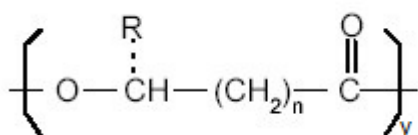


Figura 2.1: unità monomerica dei poliidrossialcanoati ($n = n^\circ$ di CH_2 della catena lineare, $y = n^\circ$ delle unità ripetitive, tipicamente $100 \div 30000$)

La generica struttura del monomero costituente i PHA è riportata in figura 2.1; la caratteristica di chiralità del monomero, origina polimeri dotati di regolarità sterica; i principali tipi di PHA identificati sono composti da monomeri appartenenti al gruppo dei $\beta/3$ (R-) idrossiacidi, ed in misura minore anche γ , δ , ϵ (R-) idrossiacidi. Il gruppo laterale “R” in posizione β (3) è un alchile con $C=1 \div 13$, che può essere di tipo lineare o ramificato, saturo o insaturo, con sostituenti aromatici oppure alogenati. A seconda della lunghezza della catena laterale, i PHA si distinguono in polimeri a catena laterale corta ($R = \text{CH}_3 \div \text{C}_2\text{H}_5$) o a catena laterale media ($R = \text{C}_3\text{H}_7 \div \text{C}_{13}\text{H}_{27}$).

Il tipo di batterio e la composizione del mezzo di coltura hanno effetto sulla struttura chimica dei PHA ottenuti, infatti la loro sintesi da parte dei diversi ceppi batterici avviene utilizzando intermedi provenienti da percorsi metabolici differenti [10], come ad esempio quelli riepilogati in tabella 2.1.

Tabella 2.1: esempi dell’influenza della specie batterica e del substrato sulla lunghezza della catena laterale dei PHA.

Specie	<i>Pseudomonas</i>	<i>Ralstonia</i>
Substrato	3 idrossiacil-CoA** di acidi con $C \leq 16$	acetil-CoA*, esenoil-CoA*, crotonil-CoA*, metilmalonil-CoA
Lunghezza catena laterale	Media	Corta

*dal processo di degradazione degli acidi grassi

**dal processo di β -ossidazione degli acidi grassi

La differente tipologia dei gruppi sostituenti della catena laterale configura una notevole variabilità nelle proprietà dei PHA, infatti è possibile riscontrare nella loro famiglia polimeri termoplastici di natura rigida come il poliidrossibutirrato (PHB) o elastomeri termoplastici come il poliidrossiottanoato (PHO), mentre il loro peso molecolare è compreso nel range $10 \div 5000$ kDa. Alcune strutture molecolari dei principali PHA, sono riportate in tabella 2.2; sicuramente tra i membri della famiglia dei PHA, i più interessanti dal punto di vista commerciale e quindi i più studiati sono

il PHB, il poliidrossivalerato (PHV), ed il copolimero poliidrossibutirrato-co-idrossivalerato (PHBHV).

Tabella 2.2: struttura molecolare dei principali PHA [10].

	<i>n=1</i>	<i>n=2</i>	<i>n=3</i>
R=H	poli(3-idrossipropionato)	poli(4-idrossibutirrato)	poli(5-idrossivalerato)
R=CH₃	poli(3-idrossibutirrato)	poli(4-idrossivalerato)	poli(5-idrossiesanoato)
R=C₂H₅	poli(3-idrossivalerato)		
R=C₃H₇	poli(3-idrossiesanoato)		
R=C₅H₁₁	Poli(3-idrossiottanoato)		
R=C₆H₁₃			
R=C₉H₁₉	poli(3-idrossidodecanoato)		
n = numero di CH₂ nella catena lineare			

2.2 Proprietà del PHB e del PHBHV: confronto con il polipropilene

Il PHB è un polimero che è stato molto studiato nei decenni passati, la sua massa molecolare è compresa nel range 10 ÷ 3000 kDa ed il suo indice di polidispersità è intorno a 2 [11]; si tratta di un polimero termoplastico, isotattico, otticamente attivo, la densità della forma amorfa e di quella cristallina sono rispettivamente di 1.26 e 1.18 g/cm³ [12].

Tabella 2.3: proprietà fisico-meccaniche del PHB, PHBHV e PP [10].

	PHB	PHBHV_{20%}	PP
Densità [g/cm³]	-	1.25	0.90
Tg [°C]	+15	-1	-10
Tf [°C]	175	145	176
Cristallinità [%]	80	42	70
Resistenza a trazione [MPa]	40	30	38
Allungamento a rottura [%]	8	50	40
Resistenza a flessione [GPa]	3.5	1.0	-
Resistenza all'urto Izod-n. [J/m]	60	300	100
Costante dielettrica a 1 MHz	3	3	-
Resistività [ohm*cm]	≥10 ¹⁶	≥10 ¹⁶	≥10 ¹⁶
Temperatura superiore di impiego [°C]	130	99	135
Resistenza chimica			
Acidi	1	1	4
Alcali	1	1	4
Alcoli	2	2	4
Oli e grassi	3	3	2/3
Resistenza agli UV	2	2	1
Tg=temperatura di transizione vetrosa; Tf=temperatura di fusione; Resistenza chimica e agli UV: 1=scarsa, 2=discreta, 3=buona, 4=ottima; PHB=poliidrossibutirrato; PHBHV=copolimero idrossibutirrato/idrossivalerato; PP=polipropilene			

Considerando le proprietà fisico-meccaniche riportate in tabella 2.3, è possibile osservare che quelle del PHB sono molto simili a quelle del polipropilene (PP), a differenza di quest'ultimo, però, il PHB presenta una resistenza all'urto modesta (60 contro 100 J/m), una temperatura di transizione vetrosa (T_g) più elevata (15 °C contro -10 °C) ed una temperatura di fusione (175 °C), prossima a quella di degradazione (circa 250 °C); questo ultimo dato evidenzia problematiche circa la lavorabilità del polimero con le tradizionali tecniche dei polimeri termoplastici [13].

Per quanto riguarda il copolimero PHBHV, è possibile osservare in tabella 2.3 come in presenza del 20 % di idrossivalerato, la cristallinità diminuisca e migliorino le proprietà meccaniche, diminuendo la resistenza a flessione ed aumentando sia l'allungamento a rottura sia la resistenza all'urto, questo si traduce in una diminuzione della fragilità ed in una maggiore lavorabilità. Occorre notare che la diminuzione della temperatura di fusione a 145 °C si mantiene a livelli accettabili senza pregiudicare eccessivamente gli impieghi del copolimero [10, 12].

Per quanto riguarda la resistenza chimica del PHB e del PHBHV occorre osservare come questa non venga influenzata dalla presenza del comonomero nel PHBHV, infatti entrambi risultano resistenti ad oli e grassi ed alla radiazione UV, mentre presentano una resistenza discreta agli alcoli e scarsa agli alcali, al contrario del PP che risulta essere molto resistente a questi ultimi due composti.

2.3 Biodegradabilità

Questa proprietà, insieme alla possibilità di ottenere i PHA da fonti rinnovabili, risulta essere di gran lunga la più vantaggiosa, prevenendo l'accumulo di questi materiali nell'ambiente al contrario delle plastiche tradizionali, prodotte a partire dal petrolio e non biodegradabili.

Nel caso in cui un manufatto prodotto con i PHA dovesse venire in contatto con l'ambiente, potrà essere degradato da diversi tipi di microrganismi in grado di secernere opportuni enzimi extracellulari (le cosiddette depolimerasi) che catalizzano l'idrolisi del polimero a molecole semplici idrosolubili; queste molecole a loro volta potranno essere utilizzate dagli stessi microrganismi come nutrienti per il loro metabolismo. I prodotti finali della degradazione risulteranno essere: in ambiente aerobico, acqua ed anidride carbonica, ed in ambiente anaerobico, anidride carbonica e metano [14].

La velocità di biodegradazione dipende sia dalle condizioni ambientali sia dal tipo di microrganismo, ed è influenzata anche dalle caratteristiche stesse del polimero come la composizione, la cristallinità ed il peso molecolare [15], oltre che dall'area superficiale [16].

2.4 Applicazioni

Grazie alle loro proprietà ed alla possibilità di ottenere copolimeri con caratteristiche diverse in base al grado di sostituzione ed al tipo dei monomeri sostituenti, è stato stimato che il PHB ed i suoi copolimeri possano gradualmente sostituire alcuni polimeri tradizionali, come riportato in tabella 2.4.

I campi di applicazione risultano essere diversi: inizialmente impiegati per la produzione di bottiglie e posate, grazie alla lavorabilità dei copolimeri è stato possibile utilizzarli nel settore del packaging per produrre borse, scatole, schiume ed in generale prodotti usa e getta; la loro biodegradabilità consente inoltre l'applicazione in campo agricolo, infatti i teli per pacciamatura attualmente prodotti in polietilene potrebbero essere sostituiti da teli in polimero biodegradabile ovviando al problema della rimozione e dello smaltimento al termine delle colture per cui sono stati impiegati.

Se estrusi sotto forma di fibre, potrebbero essere inoltre impiegati per la produzione di filtri per sigarette oppure nel settore dell'arredamento o in quello dell'automotive [8].

Tabella 2.4: potenziale di sostituibilità tecnica dei PHA in accordo con le informazioni fornite da alcuni produttori [8].

	PVC	PE-HD	PE-LD	PP	PS	PMMA	PA	PET	PBT	PC	POM	PUR	ABS
P(3HB)	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+
P(3HB-co-3HHx)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
++ sostituibilità completa; + sostituibilità parziale; nessuna sostituibilità													

Crescente interesse sta suscitando l'applicazione di questi polimeri in campo medico, grazie alla loro elevata biocompatibilità: possono essere utilizzati a contatto con tessuti umani o animali senza il rilascio di composti tossici dovuti alla loro decomposizione. Essi vengono utilizzati in campo chirurgico sotto forma di filo per suture e bendaggi oppure come “stent” e valvole cardiache artificiali, o ancora per la produzione di protesi ossee o nell'ingegneria tissutale [17,18]; vengono anche impiegati in campo farmaceutico per medicazioni che consentano il rilascio controllato di antibiotici, ormoni o farmaci antitumorali [19].

2.5 Biosintesi

Oltre 250 specie diverse di batteri sono in grado di sintetizzare i PHA, la loro biosintesi è stata oggetto di studi approfonditi nel corso di questi anni, e può essere riassunta in 8 vie rappresentate in figura 2.2.

Considerando in particolare la biosintesi del PHB, essa è operata, nella maggior parte degli organismi studiati, secondo la via metabolica “classica” (Pathway I) a partire dall'acetil-coenzima A (acetil-CoA) attraverso una serie di tre reazioni catalizzate dagli enzimi:

- 3-chetotolasi.
- Acetoacetil-coenzima A riduttasi
- Poli(3idrossibutirrato) polimerasi.

Il primo passo consiste nella conversione della fonte di carbonio in piruvato, dal quale viene originato l'acetil-Co-A. L'acetil-Co-A che normalmente entra nel ciclo di Krebs, per la produzione di carbonio ed energia, in questo caso viene utilizzato per la sintesi del monomero. Nella prima reazione l'enzima 3-chetotolasi (PhaA) unisce due molecole di acetil-Co-A con formazione dell'acetoacetil-Co-A. Nella seconda reazione, l'enzima acetoacetil-Co-A riduttasi (PhaB), opera una riduzione dell'acetoacetil-Co-A a 3-idrossibutirrato-Co-A a spese del NADH. Nella terza reazione l'enzima PHB sintasi (PhaC) innesca la reazione di polimerizzazione del 3-idrossibutirrato-Co-A con conseguente formazione del polimero e rilascio del Co-A. L'elevata regolarità sterica è da imputare proprio a quest'ultima reazione. L'enzima PHB sintasi introduce nella catena polimerica in crescita i monomeri in maniera tale che la catena polimerica risultante sia nella forma R [20].

Questo meccanismo di sintesi viene spiegato dal fatto che durante la fase di crescita esponenziale l'enzima 3-chetotolasi è inibito dalla presenza del Co-A libero derivante dal ciclo di Krebs, ma in presenza di un eccesso di fonte di carbonio, ovvero quando subentra la carenza di uno dei macronutrienti (N, P, S) tutto il surplus di acetil-Co-A prodotto dal batterio sarà utilizzato dallo stesso per la sintesi del PHB [20].

La sintesi di copolimeri come il PHBHV può essere ottenuta mediante l'aggiunta di composti particolari, detti precursori, al terreno di coltura; nel caso di questo particolare copolimero i precursori da aggiungere sono l'acido valerico o l'acido propionico.

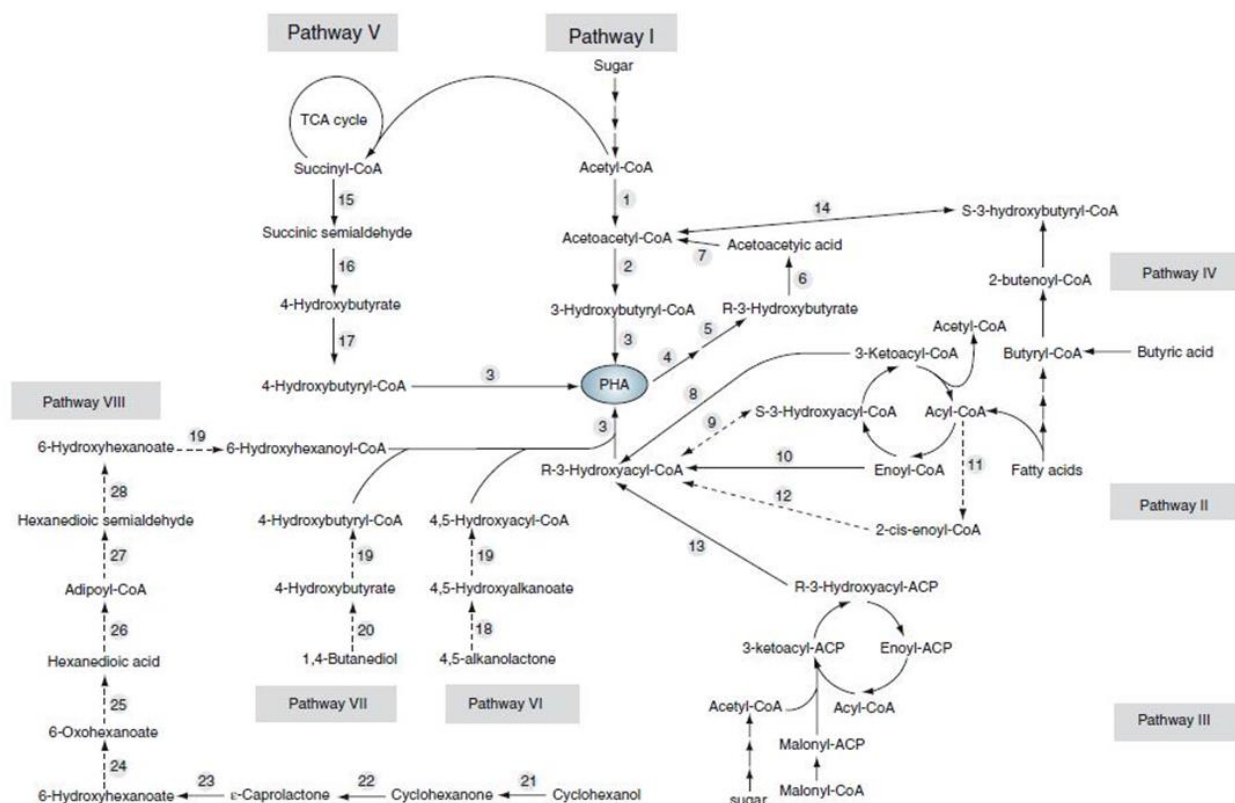


Figura 2.2: rappresentazione delle 8 vie metaboliche di sintesi dei PHA [21].

2.6 Substrati economici per la produzione di PHA

Il costo del substrato può incidere fino al 50 % sul costo di produzione dei PHA [22,23], per questo motivo occorre utilizzare materie prime economiche che consentano il maggiore contenimento dei costi possibile, questo obiettivo può essere raggiunto impiegando scarti dell'industria agroalimentare. L'impiego di questi materiali comporta un duplice vantaggio: da un lato il poter utilizzare un substrato a basso costo e rinnovabile, per la produzione dei PHA, dall'altro la riduzione parziale o totale di scarti industriali che comportano una voce di spesa consistente per il loro smaltimento, andando così a gravare sui costi di produzione. Tra i principali scarti dell'industria impiegati per la produzione di PHA, si trovano: gli scarti cellulosici derivanti da coltivazioni cerealicole, il melasso, gli oli vegetali, le acque reflue, il metanolo ed i sottoprodotti dell'industria casearia [24].

2.6.1 Scarti di natura cellulosica derivanti da coltivazioni cerealicole

Le coltivazioni cerealicole come quelle del frumento e del riso, comportano la produzione di scarti costituiti principalmente dai tegumenti esterni dei semi (crusca). Questi tegumenti sono composti dal 30-50 % di cellulosa, dal 20-50 % di emicellulosa e dal 15-35 % di lignina [25].

Al fine di poter impiegare questi scarti nei processi di fermentazione, occorre sottoporli a dei pre-trattamenti di idrolisi in maniera da ottenere zuccheri semplici utilizzabili in fermentazione; per esempio, Van-Thuoc *et al.* [26], nel loro studio, hanno utilizzato idrolizzato di crusca di frumento per la coltivazione di *Halomonas boliviensis* ottenendo una concentrazione di biomassa pari a 3.19 g l⁻¹

ed una resa in PHA riferita alla biomassa pari al 33.8% [26]. In un altro studio condotto da Huang *et al.* [27] sono stati impiegati gli idrolizzati ottenuti attraverso l'estrusione ed il trattamento enzimatico di crusca di riso ed amido di mais, in rapporto 1:8, per la coltivazione di *Haloferax mediterranei* ottenendo una concentrazione di biomassa pari a 140 g l⁻¹ ed una resa in PHA pari al 55.6%.

2.6.2 Melasso

Il melasso è ottenuto come sottoprodotto dell'industria saccarifera a seguito della lavorazione della canna da zucchero e delle barbabietole, contiene un elevato quantitativo di saccarosio (prossimo al 50%) che non risulta economicamente conveniente estrarre, oltre ad altre sostanze come sali e sostanze azotate [24].

Il melasso non può essere utilizzato nell'industria alimentare ma trova impiego come substrato a basso costo nei processi di fermentazione dedicati alla produzione di bioetanolo.

In letteratura sono presenti diversi studi in cui è stato impiegato il melasso per ottenere PHA: ad esempio, Albuquerque *et al.* hanno impiegato il melasso per la coltivazione di un consorzio microbico in grado di sintetizzare PHBHV raggiungendo una concentrazione di biomassa di 3.5 g l⁻¹ ed una resa pari al 30 % [28]; in un altro lavoro è stato utilizzato il *Bacillus sp* COLI/A6 ottenendo una concentrazione di biomassa pari a 6 g l⁻¹ ed una resa in PHA del 54.68 % [29]; Omar *et al.* [30], utilizzando il 5% di melasso da canna da zucchero addizionato al terreno di coltura per la produzione di PHB con *Bacillus megaterium*, hanno ottenuto una concentrazione di biomassa di 3 g l⁻¹ ed una resa in PHA del 50 % [30].

2.6.3 Oli vegetali

Lo smaltimento di olii alimentari esausti derivanti da processi di cottura industriali e domestici, costituisce un problema sia di natura economica sia ambientale. Lo sversamento di queste sostanze nelle acque superficiali comporta un inquinamento persistente e la de-ossigenazione dei corpi ricettori, nonché la potenziale contaminazione delle falde acquifere.

L'impiego di questi scarti nella produzione di PHA, come substrato a basso costo, costituisce una potenziale soluzione sia dal punto di vista economico che da quello ambientale.

Secondo alcuni studi presenti in letteratura, impiegando olio di palma per la fermentazione con un microrganismo ingegnerizzato, il *Cupriavidus necator* H16, è stata ottenuta una concentrazione di biomassa pari a 7.9 g l⁻¹ ed una resa di PHB pari al 79 %, inoltre, addizionando opportuni precursori alle medesime colture, è stato possibile ottenere il copolimero PHBHV con una resa in pari all'80 % [31]. Fukui e Doi [32], impiegando un microrganismo "wild type", *Ralstonia metallidurans*, attraverso la fermentazione di oli di tipo diverso, hanno ottenuto rese in PHA significative: 79 % con olio di oliva, 91 % con olio di mais e 79 % con olio di palma.

2.6.4 Acque reflue

In letteratura è stato studiato l'utilizzo di acque reflue di diversa origine per la produzione di PHA: derivanti da scarichi domestici, derivanti dall'industria alimentare (conserviera, produzione di birra, olio, etc.), derivanti dall'industria cartaria e derivanti dalla produzione di biodiesel.

Solitamente è necessario un processo di pre-trattamento per ottenere acidi grassi volatili che possano essere utilizzati in fermentazione, inoltre, nella maggior parte dei casi si ricorre all'impiego di consorzi microbici; ad esempio Bengtsson *et al.* utilizzando reflui di cartiera hanno ottenuto una

resa di PHBHV del 48.3 % [34], mentre Yan *et al.* utilizzando “pulper” di cartiera hanno raggiunto una resa in PHA del 43 % [35].

2.6.5 Metanolo

Il metanolo può essere prodotto attraverso la fermentazione anaerobica di materiali legnosi e substrati di natura organica, e può costituire una fonte di carbonio economica per la produzione di PHA.

Yezza *et al.* [36] hanno utilizzato un batterio metilotrofico, il *Methylobacterium sp* GW2 per la produzione di PHB, ottenendo una resa del 40 %; Bourque *et al.* [37] hanno invece impiegato il *Methylobacterium extorquens* per produrre PHBHV aggiungendo oltre al metanolo, nel terreno di coltura, anche un sale dell’acido valerico, ottenendo una concentrazione di biomassa di 9 g l⁻¹ ed una resa del 33 %.

2.6.7 Sottoprodotti dell’industria casearia

I sottoprodotti dell’industria casearia sono costituiti dal siero di latte (ottenuto dal processo di caseificazione), dalla scotta (ottenuta dal processo di produzione della ricotta) e dal latticello (ottenuto dalla produzione del burro). Il volume di questi sottoprodotti risulta molto consistente e sebbene una certa quota trovi un re-impiego all’interno dei processi produttivi caseari, la restante parte viene destinata allo smaltimento come “rifiuto speciale non pericoloso” ai sensi della normativa italiana (D.Lgs. 22/1997, D.M. 125/06).

Da ciò, deriva la necessità di mettere a punto un processo che consenta di valorizzare questi sottoprodotti, sia dal punto di vista di eventuali frazioni nobili recuperabili attraverso processi di pretrattamento, sia dal punto di vista della fermentazione della frazione zuccherina contenuta (lattosio) per l’ottenimento di PHA.

Nei prossimi capitoli verrà effettuata un’ampia trattazione dei vari aspetti di disponibilità e valorizzazione di questi sottoprodotti.

3. L'industria casearia

3.1 Volumi di produzione

Dal 1974 al 2009 la produzione di latte ha subito un aumento su scala nazionale di oltre il 32% (dati Assolatte), il fattore di rilievo, osservabile nella Tabella 3.1 risulta essere la variazione della destinazione d'uso del latte prodotto.

In particolare occorre notare come il consumo di latte (fresco, pastorizzato, UHT) destinato all'alimentazione umana sia diminuito da 4 milioni di tonnellate nel 1974, a circa 2,8 milioni nel 2009 con un decremento del 28%, mentre la quota destinata alla trasformazione industriale sia aumentata da 5,5 milioni di tonnellate del 1974 a 9,6 milioni nel 2009 con una crescita del 76%.

La produzione totale di latte sul territorio Italiano, nell'anno 2008, secondo l'ISTAT, è stata di 11.181.864 t (questi dati si discostano dell'11% in difetto rispetto a quelli forniti da Assolatte), di cui 2.760.404 t sono destinate al consumo alimentare; le restanti 8.421.460 t vengono destinate alla produzione industriale dei derivati, costituiti in particolare da:

- Formaggi.
- Burro.
- Yoghurt.
- Preparati a base di latte.
- Crema o panna da consumo.
- Desserts.
- Latte concentrato.

Tabella 3.1: destinazione del latte bovino dal 1974 al 2009, fonte Assolatte.

Anno	Alimentazione umana	Indici	Trasformazione industriale	Indici	Totali	Indici
1974	4.000.000	100	5.494.747	100	9.494.747	100
1975	4.000.000	100	5.141.227	93	9.141.227	96
1976	4.200.000	105	5.424.374	98	9.624.374	101
1977	4.200.000	105	5.844.263	106	10.044.263	106
1978	4.300.000	107	6.274.212	114	10.574.212	111
1979	4.350.000	108	6.756.330	123	11.106.330	117
1980	4.500.000	112	6.650.966	121	11.150.966	117
1981	4.490.800	112	6.638.590	120	11.129.390	117
1982	4.500.000	112	7.112.653	129	11.612.653	122
1983	4.510.052	112	7.264.450	132	11.774.502	124
1984	4.449.429	111	7.300.639	133	11.750.068	124
1985	4.536.600	113	7.596.658	138	12.133.258	128
1986	4.432.000	111	7.625.969	139	12.057.969	127
1987	4.395.000	110	7.725.811	141	12.120.811	128
1988	4.333.794	108	7.957.191	145	12.290.985	129
1989	3.797.621	95	8.278.085	151	12.075.706	127
1990	3.684.266	92	8.890.739	162	12.575.005	132
1991	3.693.293	92	8.996.050	164	12.689.343	134
1992	3.8033.095	95	8.922.791	162	12.725.886	134

Anno	Alimentazione umana	Indici	Trasformazione industriale	Indici	Totali	Indici
1993	3.185.856	80	8.664.788	158	11.850.644	125
1994	3.090.167	77	8.882.857	162	11.973.024	126
1995	3.006.359	75	9.134.398	166	12.140.757	128
1996	3.064.892	77	9.335.390	170	12.400.282	131
1997	3.063.509	77	9.501.213	173	12.564.722	132
1998	3.072.000	77	9.365.329	170	12.437.329	131
1999	3.080.000	77	9.248.305	168	12.328.305	130
2000	3.070.000	77	9.091.156	165	12.161.156	128
2001	3.040.000	76	9.118.219	165	12.158.219	128
2002	2.989.960	75	9.378.414	171	12.368.374	130
2003	2.920.000	73	9.583.098	174	12.503.098	131
2004	2.882.600	72	9.685.929	176	12.568.529	132
2005	2.899.952	72	9.672.931	176	12.572.883	132
2006	2.905.000	73	9.605.930	175	12.510.930	132
2007	2.899.952	72	9.703.065	177	12.603.017	133
2008	2.884.487	72	9.614.359	175	12.498.846	132
2009	2.867.609	72	9.666.979	176	12.534.588	132

Tabella 3.2: distribuzione per taglia di produzione delle unità produttive operanti nel settore lattiero caseario [38, 39]

Classi di ampiezza [t/anno]	N° Stabilimenti	Produzione di formaggio [t/anno]
Fino a 10	157	794
11-25	199	3.468
26-50	204	7.545
51-100	281	20.539
101-200	315	45.923
201-500	392	123.414
501-1.000	173	122.633
1.001-2.000	116	164.107
Oltre 2.000	114	673.065
Totale	1.951	1.161.488

Le unità produttive operanti nel settore lattiero-caseario per la produzione di formaggio, possono essere raggruppate in base all'ampiezza della produzione in termini di tonnellate di prodotto annue. Nell'anno 2008, in Italia, si è registrata la distribuzione riepilogata in Tabella 3.2: molte di queste unità produttive risultano di taglia medio piccola, ne consegue un'organizzazione della filiera frammentata, soprattutto nell'ottica di una raccolta capillare dei sottoprodotti delle attività produttive.

3.2 Processi di produzione

Il quantitativo di formaggi prodotto in Italia, nel 2008, è stato pari a 1.161.487 t da cui deriva come sottoprodotto principale il siero di latte.

Il siero viene utilizzato, nella maggior parte dei casi, per la produzione della ricotta e talvolta scremato per la produzione di panna e burro. Queste ulteriori lavorazioni danno origine, rispettivamente, a due ulteriori sottoprodotti: la scotta ed il latticello.

Lo schema tecnologico relativo al processo di produzione dell'industria lattiero casearia è riportato nella Figura 3.1.

La produzione totale di siero in Italia, nell'anno 2008, (Figura 3.2) ammonta a 6.968.922 t (calcolo effettuato sulla base della produzione di formaggio italiana utilizzando la correlazione elaborata dall'ANPA [40]), di cui 4.725.696 t sono state riutilizzate secondo queste modalità:

- Impiego per la produzione di ricotta.
- Impiego sotto forma liquida per l'alimentazione del bestiame.
- Impiego sotto forma concentrata.
- In polvere.

Le restanti 2.243.225 t di siero, destinate allo smaltimento, ed eventualmente disponibili per la produzione di PHA, sono distribuite su base regionale secondo il grafico riportato di Figura 3.3.

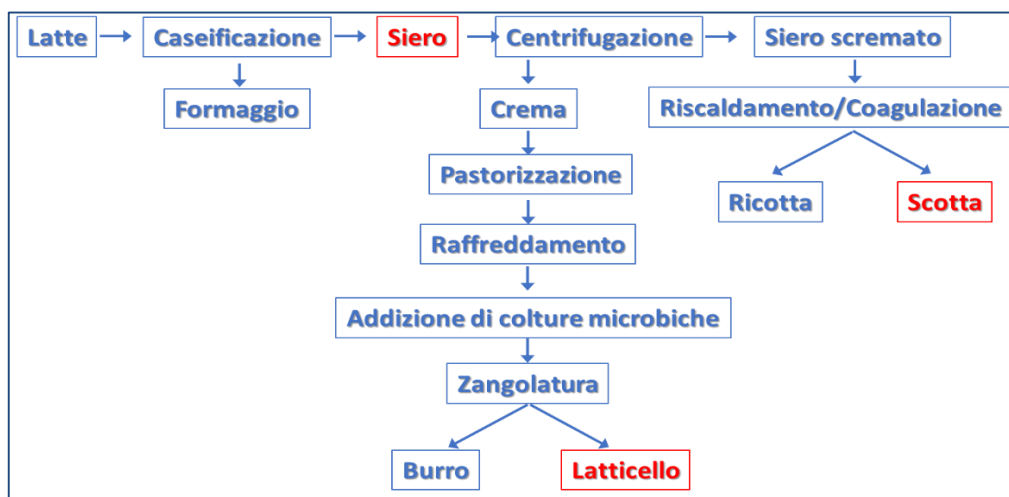


Figura 3.1: schema tecnologico del processo produttivo dell'industria lattiero-casearia [41].

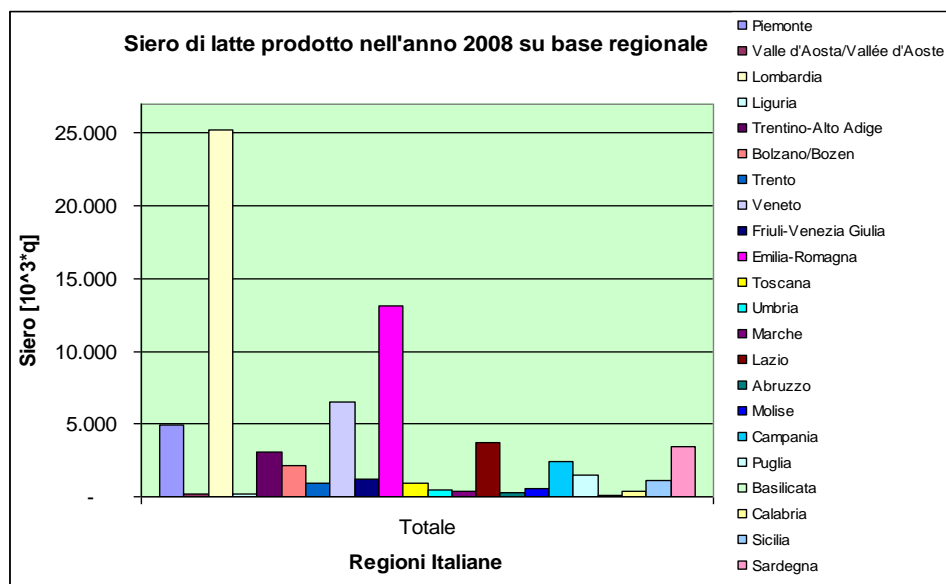


Figura 3.2: produzione totale di siero di latte nell'anno 2008 in Italia.

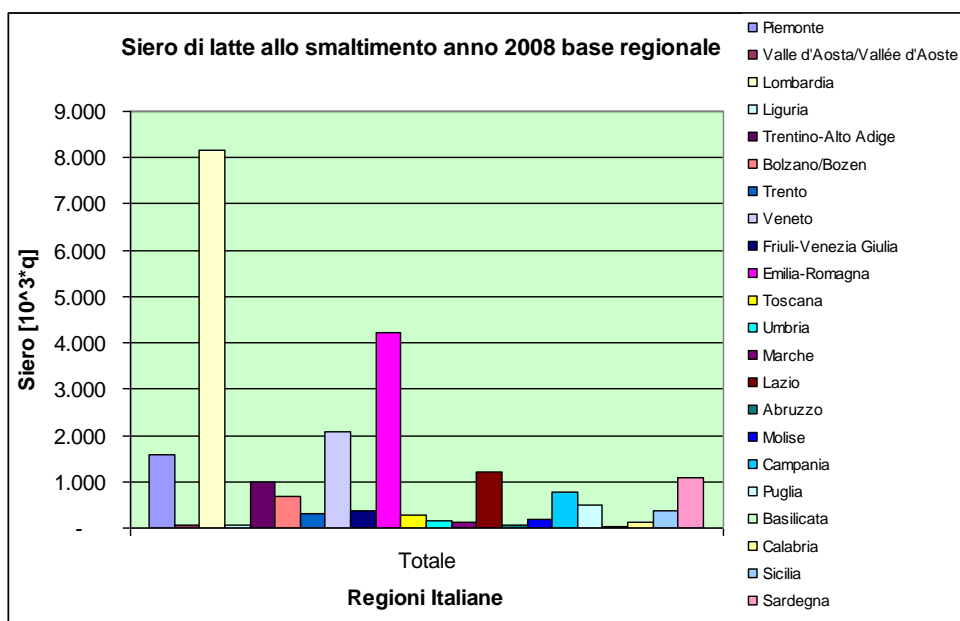


Figura 3.3: distribuzione Regionale del siero di latte destinato allo smaltimento in Italia.

La distribuzione temporale della disponibilità di siero di latte bovino su base annuale, calcolata sulla base della produzione di latte nell'anno 2009, presenta un andamento pressoché costante come osservabile in Figura 3.4; da questa situazione, deriverebbe una disponibilità del sottoprodotto "costante", durante l'anno, per alimentare il processo di produzione dei PHA.

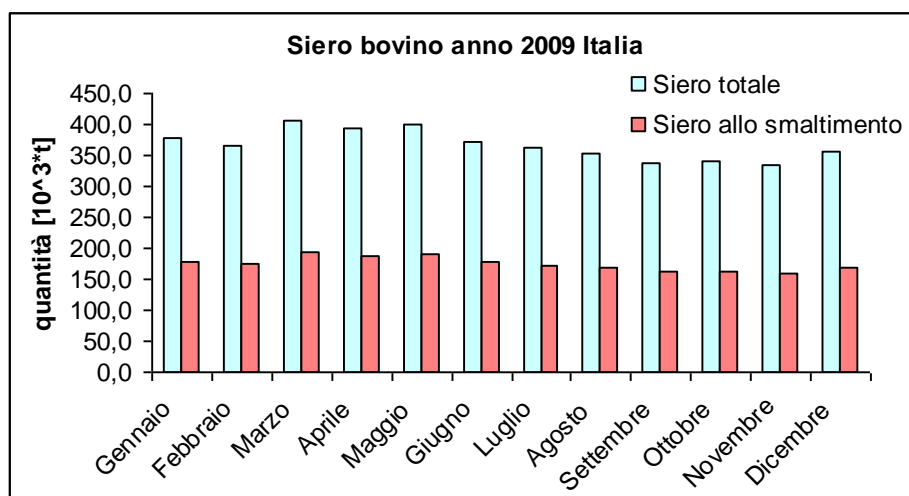


Figura 3.4: produzione di siero di latte su base mensile nell'anno 2009 in Italia.

3.3 I sottoprodotti: siero di latte, scotta e latticello

Il **siero di latte** si può distinguere in due tipologie: *dolce* ed *acidificato*, in funzione delle condizioni del processo di caseificazione adottato. Il siero *dolce* deriva dalla produzione di formaggi poco acidificati prevalentemente freschi (es. robiole, tommini, primo sale etc.) o stagionati (es: tome, fontina etc.), il siero *acido* deriva dalla produzione di formaggi a pasta filata (es. mozzarelle, scamorze etc.). La composizione di questi sieri differisce principalmente per il contenuto di acidi organici ed il pH; una composizione indicativa del siero di latte è riportata in Tabella 3.3 [39].

Tabella 3.3: composizione indicativa del siero di latte [39].

Sostanze presenti	% p/p
Lattosio	4.5
Proteine	0.75
Grassi	0.40
Ceneri	0.70
Vitamine [mg/l]	12
Acidi organici	Assenti (<i>dolce</i>) – 0.15 (<i>acidificato</i>)
pH	5.8-6 (<i>dolce</i>) – 4.9-5.5 (<i>acidificato</i>)
COD [mg/l]	50.000

La **scotta** è il residuo della produzione della ricotta, pertanto è costituita da siero depauperato in grasso e proteine ed arricchito in sali ed acidi organici, impiegati come coadiuvanti tecnologici (sali di sodio o potassio e di magnesio, acido lattico e/o citrico). La qualità è modesta per il limitato contenuto in costituenti nobili (peraltro presenti allo stato denaturato, nel caso delle proteine e dei costituenti bioattivi (vitamine). Una composizione indicativa della scotta è riportata in Tabella 3.4.

Tabella 3.4: composizione indicativa della scotta [39].

Sostanze presenti	% p/p
Lattosio	4
Sostanze azotate (x 6,38)	0.15
Grassi	0.2
Ceneri	1
Acidi Organici	0.2
pH	5.6-6.2
COD [mg/l]	25.000

Tabella 3.5: composizione indicativa del latticello [39].

Sostanze presenti	% p/p
Solidi sospesi totali	8.3
Lattosio	4.2
Proteine	3.4
Grassi	0.7
Ceneri	0.8
Acidi Organici	0.15
COD [mg/l]	>70.000

Per quanto riguarda il latticello, esso è ottenuto come residuo della lavorazione del burro, a volte viene erroneamente confuso con la fase liquida presente all'interno della mozzarella e/o con l'acqua

di filatura; la sua composizione, riportata in Tabella 3.5 è diversa dal siero per quanto riguarda la componente proteica e quella lipidica, dato che il processo di centrifugazione comporta una concentrazione di queste frazioni all'interno della crema destinata alla produzione del burro.

In Italia è stata registrata una produzione di latticello pari a 52.979 t nell'anno 2008, secondo la distribuzione regionale riportata in Figura 3.5.

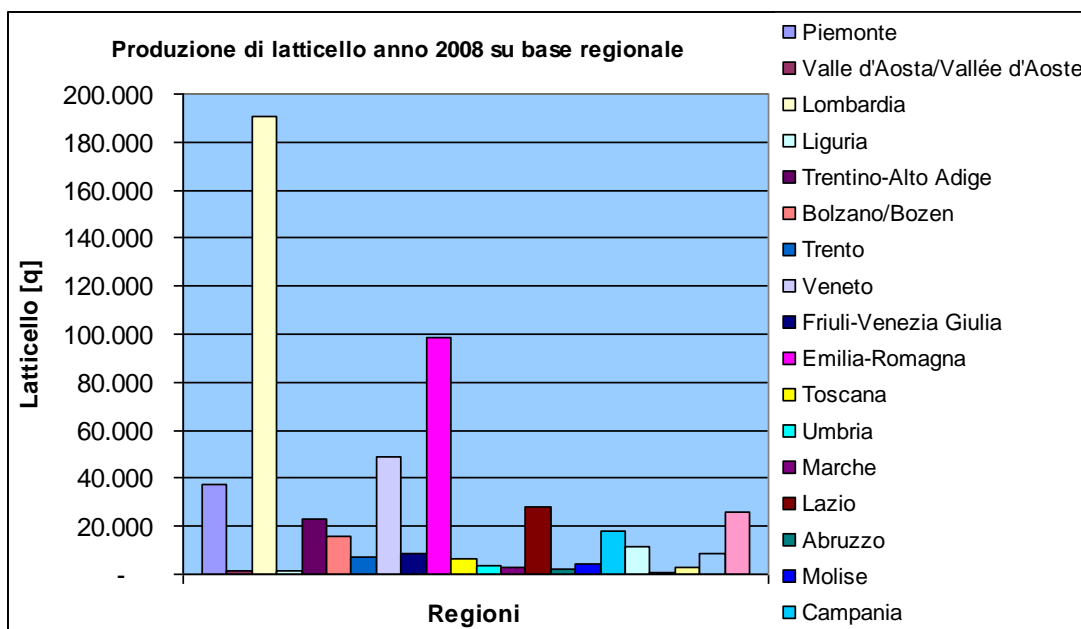


Figura 3.5: Produzione di latticello nell'anno 2008 in Italia su base regionale.

4. Pretrattamento dei sottoprodotti dell'industria casearia per la produzione di PHA

Come evidenziato nel precedente Capitolo 3, i sottoprodotti dell'industria casearia, contengono frazioni nobili come i lipidi e le proteine, che potrebbero essere valorizzate attraverso processi di separazione che ne consentano il recupero.

A questo scopo sarebbe possibile introdurre due tipi di pretrattamento da effettuare su questi sottoprodotti in ordine consecutivo:

- La precipitazione termocalcica che consente la separazione dei lipidi.
- L'ultrafiltrazione che consente il recupero delle proteine.

4.1 Precipitazione termocalcica

La precipitazione termocalcica si basa su di un trattamento termico abbinato a due reazioni chimiche:

- Un'aggregazione fra i lipidi e gli ioni Calcio presenti nel siero di latte.
- Una correzione del pH con idrossido di sodio.

Il primo scienziato a mettere a punto questo processo è stato Attebery sul finire degli anni '60 [42]; la frazione lipidica è responsabile non solo della torbidità dei sieri, ma soprattutto della difficoltà di separare dal siero di latte la frazione proteica ottenibile tramite il processo di ultrafiltrazione sotto forma di concentrato di proteine (Whey Protein Concentrate o WPC): i lipidi causano il "fouling" delle membrane impiegate in ultrafiltrazione, riducendone sia il flusso, sia la vita utile e contaminano i WPC riducendone la purezza.

I lipidi stessi, se separati efficacemente, possono costituire un prodotto di interesse per l'industria alimentare che se ne può servire per integrare prodotti quali maionese, margarina o latte in polvere [43, 44].

Il processo di precipitazione termocalcica è stato oggetto di molti studi, in cui ne è valutata l'efficacia su diversi tipi di siero di latte [45, 46]; nel 1987 sono state individuate delle condizioni di lavoro idonee per tutti i sieri:

- Correzione del contenuto di calcio del siero mediante l'aggiunzione di cloruro di calcio (CaCl_2) fino alla concentrazione di 1.2 g/l (espressa come Ca^{2+}).
- Correzione del pH al valore di 7.3 mediante l'aggiunta di idrossido di sodio.
- Riscaldamento del siero di latte a 50 °C per 8 minuti [47].

Queste condizioni costituiscono la base di lavori condotti successivamente che hanno affinato il processo: nel 1992 è stata effettuata un'estesa indagine da Pierre *et al.* sulle variabili di processo per valutarne l'impatto sull'efficacia del metodo [48]. Questo studio dimostra come il pH iniziale del siero sia irrilevante, mentre la concentrazione di ioni calcio ed il valore di pH dopo la correzione con idrossido di sodio siano le variabili fondamentali del processo.

Nel 1995, è stato osservato, da Gesan *et al.* [49], come il pH tenda ad abbassarsi durante il riscaldamento; per ovviare a questo problema il procedimento è stato modificato mantenendolo costante per tutta la durata del trattamento termico.

Studi condotti successivamente hanno introdotto ulteriori modifiche nel processo allo scopo di renderlo applicabile su scala industriale: l'aggiunzione del CaCl_2 è stata inserita dopo il riscaldamento del siero di latte, per evitare la precipitazione di calcio e problemi di corrosione causati dal cloro [50].

Rombaut e Dewettink, più recentemente, hanno ulteriormente affinato il processo, individuando come ottimali la temperatura di 55 °C ed un valore di pH pari a 7.7 [51].

4.2 Ultrafiltrazione

L'ultrafiltrazione (UF) opera utilizzando membrane semipermeabili caratterizzate da:

- Diametro dei pori 1÷20 nm.
- Cut-off di membrana: 1÷1000 kDa.

Durante il processo di separazione le macromolecole con un peso molecolare superiore al cut-off della membrana sono trattenute, mentre quelle con peso molecolare inferiore permeano attraverso i pori [52]. La quota parte di sospensione che attraversa la membrana viene identificata come permeato, mentre i solidi sospesi che vengono trattenuti dalla membrana si identificano come retentato.

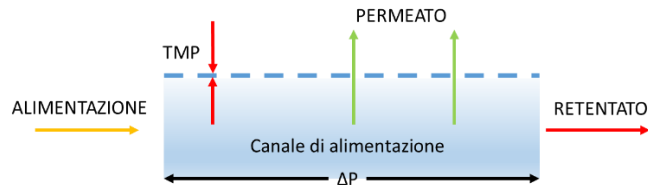


Figura 4.1: flussi e perdite di carico in un processo di filtrazione tangenziale.

La forza spingente del processo è rappresentata dalla TMP (pressione di trans-membrana). La TMP dipende dalla perdita di carico che subisce il fluido nell'attraversamento della membrana: tanto più le dimensioni dei pori della membrana sono ridotte, tanto più sarà elevata la perdita di carico da superare. Nell'operazione di ultrafiltrazione tangenziale si possono raggiungere TMP comprese nel range 0.15-15 ata.

I materiali di costruzione delle membrane per ultrafiltrazione più impiegati sono:

- Acetato di cellulosa (CA).
- Polivinilidenfluoruro (PVDF).
- Poliacrilonitrile (PAN).
- Polietersolfone (PES).
- Materiali ceramici.

Se le condizioni operative (soprattutto il pH e la conducibilità delle sospensioni da trattare) lo consentono, il materiale di costruzione della membrana viene scelto non solo in base alle dimensioni delle proteine da separare, ma viene tenuto conto anche delle interazioni elettrostatiche che si vengono a creare tra le proteine cariche, gli elettroliti presenti in soluzione e la membrana stessa [52].

Le applicazioni dell'ultrafiltrazione in campo industriale sono svariate: dal settore alimentare (recupero di proteine dal siero di latte, chiarificazione dei succhi di frutta) all'industria tessile, a processi dell'industria cartaria e come pretrattamento negli impianti di dissalazione operanti ad osmosi inversa.

L'ultrafiltrazione può essere classificata in base alla direzione del flusso di alimentazione rispetto alla membrana:

- “Dead end”: la direzione del flusso è ortogonale alla superficie della membrana; si ha la formazione di uno strato di solido (“cake” o torta di filtrazione) che causa un decadimento graduale delle prestazioni del sistema.
- “Tangenziale” (TFF): la direzione del flusso dell'alimentazione è parallela alla superficie della membrana; la turbolenza che si viene a creare riduce la velocità di formazione della torta, mantenendo elevate le prestazioni del processo.

I fenomeni che influenzano maggiormente l'operazione di ultrafiltrazione sono tre:

- “Gel layer”: accumulo reversibile di materiale sulla superficie della membrana; causa una forte limitazione delle prestazioni per graduale ostruzione dei pori.

- “*Fouling*”: accumulo irreversibile di materiale sulla superficie porosa o all’interno dei pori della membrana; causa una diminuzione anche drastica dei flussi.
- “*Polarizzazione di concentrazione*”: considerando il profilo di concentrazione del soluto fra monte e valle della membrana, si ha la formazione di un gradiente di concentrazione che può portare al superamento del prodotto di solubilità con conseguente precipitazione del soluto. Questo fenomeno crea una controdiffusione e genera un aumento della pressione osmotica con conseguente diminuzione delle prestazioni del processo.

La scelta della geometria della membrana (cioè del tipo di modulo e della luce dei canali), del materiale di cui la membrana è costituita, oltre all’ottimizzazione dei parametri operativi sono fondamentali per limitare questi tre fenomeni.

Il materiale di cui è costituita o rivestita la membrana influenza pesantemente le prestazioni, per questo motivo le proprietà delle membrane rivestite sono oggetto di studio da parte di numerosi autori [53].

Per incrementare le prestazioni ottenibili dalle membrane per ultrafiltrazione, si può agire sui seguenti parametri:

- Idrofobicità.
- Carica superficiale.
- Proprietà superficiali: rugosità, porosità e distribuzione dimensionale dei pori.

Dal punto di vista della geometria e del moto dei fluidi al loro interno, i moduli per ultrafiltrazione si dividono in [54]:

- Moduli a membrana piatta (“flat plate” o cassette).
- Moduli a spirale avvolta (spiral wound).
- Moduli a membrana tubolare.
- Moduli a fibre cave.

Nei *moduli a membrana piatta*, le membrane sono realizzate generalmente in polisulfone, polietersulfone e cellulosa rigenerata e vengono sostenute da piatti, che raccolgono a valle il permeato, mentre il liquido da trattare forma a monte uno strato da 0.5-3 mm di spessore. In commercio si trovano moduli con superficie di membrana fino a 50 m². I vantaggi sono dati dal fatto che le perdite di carico sono moderate, la loro scalabilità è lineare, lo smontaggio e la pulizia sono agevoli. Gli svantaggi sono dati dalla modesta turbolenza interna, per cui sono soggetti a “polarizzazione delle concentrazioni” e “fouling”.

In merito allo scale-up di questi moduli, occorre evidenziare che l’approccio più semplice è costituito dal “linear scaling” in cui la pressione, la portata del fluido e il profilo di concentrazione rimangono costanti lungo il modulo.

Lo scale-up lineare può essere ottenuto solamente mantenendo la lunghezza dei canali costante e variando l’area, aumentando o diminuendo il numero di canali/fibre posti in parallelo, perciò per consentire il “linear scaling” sono state sviluppate delle cassette termoplastiche che consentono di coprire un range di superficie filtrante che va da 100 cm² a 1 m² mediante apposite guarnizioni.

I *moduli a spirale avvolta*, sono costituiti da una serie di pellicole avvolte a spirale su di un tubo forato, per la raccolta del permeato che percorre tutto il condotto a spirale, entra nel tubo attraverso gli appositi fori ed esce dal modulo da una estremità del tubo nella zona centrale.

I vantaggi rispetto ai moduli a membrana piatta risiedono nel fatto che sono più compatti e hanno perdite di carico inferiori, mentre le minori velocità dei fluidi li rendono più sensibili al “fouling”; gli svantaggi risiedono nel fatto che la loro scalabilità non è lineare e le operazioni di smontaggio e pulizia sono complesse.

I *moduli a membrana tubolare* sono costituiti da un tubo rigido forato che funge da sostegno per la membrana semipermeabile disposta al suo interno. Essi sono costituiti da più tubi montati in parallelo (fasci tubieri). I vantaggi di questi moduli consistono nel poterli impiegare per il

processamento di liquidi viscosi e le operazioni di pulizia risultano agevoli; il principale svantaggio consiste nel rapporto superficie di filtrazione/volume piuttosto modesto.

Nei *moduli a fibre cave* le membrane sono di tipo tubolare, ottenute per estrusione [54], esse vengono montate entro mantelli cilindrici in fasci tubieri costituiti da alcune migliaia fino ad alcuni milioni di tubi.

I vantaggi di questi moduli risiedono nel fatto che resistono molto bene alla pressione, sia interna sia esterna, sono autoportanti, presentano un valore molto elevato del rapporto superficie di filtrazione/volume, che può arrivare anche a $1000 \text{ m}^2/\text{m}^3$, infine possono essere puliti facilmente con un controlavaggio. Gli svantaggi consistono nel fatto che sono molto costosi, non è possibile sostituire le fibre rotte o bucate e richiedono una pre-filtrazione molto spinta quando usati per osmosi inversa, nanofiltrazione ed ultrafiltrazione.

I moduli per ultrafiltrazione tangenziale di tipo a membrana piatta, spirale avvolta e fibra cava hanno prestazioni simili per quanto riguarda il recupero delle proteine e la conservazione della loro attività enzimatica [55], il miglior compromesso per quanto riguarda le prestazioni, la resistenza allo sporco, la scalabilità e la flessibilità è costituito dai moduli a membrana piatta.

Per tale motivo i moduli impiegati per l'ultrafiltrazione dei sottoprodotti caseari, impiegati in questo lavoro, sono stati quelli a membrana piatta.

5. Produzione di PHA da siero di latte

Tra le componenti presenti nel siero di latte, il lattosio, non avendo altri usi, né come integratore nutrizionale come invece ha la frazione proteica, né per l'industria alimentare come la frazione lipidica, è quello più indicato a supportare la crescita microbica per la sintesi dei PHA, costituendo una fonte di carbonio a basso costo.

Il problema legato all'utilizzo del lattosio come substrato è legato al fatto che non sono molti i microrganismi in grado di metabolizzarlo direttamente: la conversione del lattosio ad acetil-Co-A è infatti rapida, tuttavia non tutti gli organismi sono in grado di scindere il lattosio (dimero) nei suoi due monomeri glucosio e galattosio per mancanza genetica dell'enzima β -galattosidasi.

In alternativa, il lattosio può essere idrolizzato per via chimica o enzimatica, utilizzando successivamente i due monosaccaridi come substrato per la sintesi di PHA [55].

Un'ulteriore alternativa, più complessa, per l'utilizzo del lattosio, può essere costituita dall'operare due fermentazioni consecutive in cui la prima fermentazione, condotta in presenza di batteri lattici ed in condizioni di anaerobiosi, consente l'ottenimento di acido lattico, che viene utilizzato nella seconda fermentazione, operata in condizioni aerobiche in presenza di microrganismi come *Ralstonia eutropha* o *Alcaligenes latus*, per la sintesi dei PHA [55], attraverso la sua ossidazione ad acido piruvico e decarbossilazione ossidativa di quest'ultimo ad acetil-Co-A.

Tra le tre alternative citate, quella dell'utilizzo diretto del lattosio per la produzione di PHA costituisce la più favorevole, infatti i costi derivanti dal processo di idrolisi chimica o enzimatica oppure da una fermentazione preliminare, andranno comunque a sommarsi ai costi della fermentazione volta all'ottenimento dei PHA, incidendo in modo significativo sui costi di produzione complessivi.

Naturalmente, per poter utilizzare direttamente il lattosio, occorrono ceppi batterici idonei, oppure un consorzio microbico adeguato. Nei paragrafi seguenti verranno presentati alcuni esempi di conversione diretta del lattosio mediante l'impiego dei seguenti microrganismi:

- *Hydrogenophaga pseudoflava*
- *rEscherichia coli*
- *Thermus thermophilus*
- *Methylobacterium* ZP 24

5.1 Fermentazione con *Hydrogenophaga pseudoflava*

L'*Hydrogenophaga pseudoflava* è un batterio in grado di impiegare come substrato sia monosaccaridi come glucosio, galattosio e mannosio, sia disaccaridi come saccarosio e lattosio [56]; tuttavia la cinetica di utilizzo dei disaccaridi ai fini della produzione di PHA è minore rispetto ad un eventuale utilizzo dei prodotti di idrolisi [56].

Le condizioni operative adottate per la coltura con *Hydrogenophaga pseudoflava* sono una temperatura di 36 °C ed un pH pari a 6.8-7, mentre la concentrazione di ossigeno disciolto è il 20 % del valore di saturazione con aria [56]. Il nutriente limitante è rappresentato dall'azoto, fornito sotto forma di solfato d'ammonio (NH₄)₂SO₄. Come precursore per la sintesi del copolimero con 3-idrossivalerato, viene impiegato il valerato di sodio alla concentrazione di 1 g l⁻¹ [56].

Durante la fermentazione il nutriente limitante è consumato dopo circa 40 ore. La concentrazione massima di PHA ed il raggiungimento della fase stazionaria di crescita della biomassa si hanno entrambe dopo 45 ore.

In tabella 5.1 sono riepilogati i parametri cinetici della fermentazione: la resa dei PHA riferita al substrato è pari al 20 % e la produttività ottenuta è di 0.05 g l⁻¹ h⁻¹, valore di circa il 58 % inferiore rispetto a quanto ottenuto con l'utilizzo di lattosio idrolizzato (0.12 g l⁻¹ h⁻¹); anche la massima velocità specifica di crescita raggiunta, pari a 0.08 h⁻¹, è alquanto inferiore rispetto al caso in cui venga utilizzato lattosio idrolizzato (0.012 h⁻¹), mentre la velocità specifica di produzione di PHA,

anche se minore, assume un valore piuttosto simile se comparato al caso in cui viene impiegato il substrato idrolizzato (12.5 contro 15.0 mg l⁻¹ h⁻¹) [56].

Tabella 5.1: parametri della fermentazione condotta con Hydrogenophaga pseudoflava (μ_{max} : velocità massima specifica di crescita; q_p : velocità specifica di produzione del polimero; $Y_{PHA/S}$: resa massica riferita al substrato; $Y_{PHA/X}$: resa massica riferita alla biomassa) [56].

μ_{max} [g _{biomassa} *g _{lattosio} ⁻¹ *h ⁻¹]	q_p [mg _{PHA} *g _{lattosio} ⁻¹ *h ⁻¹]	PHA _{max} [g _{PHA} *l ⁻¹]	$Y_{PHA/S}$ % [g _{PHA} /g _{lattosio}]	$Y_{PHA/X}$ % [g _{PHA} *g _{biomassa} ⁻¹]	Produttività [g _{PHA} *l ⁻¹ *h ⁻¹]
0.08	12.5	2.7	20	40	0.05

5.2 Fermentazione con *rEscherichia coli*

Il batterio *Escherichia coli* è stato ingegnerizzato per la produzione di PHA trasferendo opportuni geni di *Ralstonia* o *Alcaligenes* [57]. Come già evidenziato in precedenza, tuttavia, utilizzando questo batterio in presenza di un substrato costituito da un disaccaride, si osserva una diminuzione della produttività rispetto all'impiego di un monosaccaride [58]. Partendo da questo presupposto, sono state messe a punto strategie di fermentazione fed-batch per massimizzare la produttività in PHA. La tecnica più promettente consiste nell'utilizzo di una membrana esterna per la separazione della biomassa dal terreno di coltura "esausto" (nel quale la concentrazione del substrato è prossima a zero) ed il suo ricircolo. Con questa tecnica sono state ottenute elevate concentrazioni di biomassa e valori di produttività nettamente superiori rispetto all'utilizzo di *Hydrogenophaga pseudoflava* [57]. Inoltre, l'efficacia di questa modalità operativa, viene confermata dal fatto che sono stati ottenuti elevati valori di produttività anche in fase di scale-up con fermentatori da 300 litri [57].

La concentrazione iniziale di lattosio adottata nel terreno di coltura è di 20 g l⁻¹, e viene mantenuta costante con l'aggiunta di una soluzione di lattosio concentrata (280 g l⁻¹) e di solfato di magnesio epta-idrato (6 g l⁻¹) [57].

Le condizioni operative impiegate sono: temperatura di esercizio di 30 °C e pH mantenuto costante a 6.95 tramite l'aggiunta di idrossido d'ammonio; la concentrazione di ossigeno disciolto è mantenuta, durante la fase di crescita esponenziale, al 30% del valore di saturazione con aria, mentre quando si raggiunge la fase di crescita stazionaria, questo valore viene diminuito al 10% [57].

Il fed-batch viene effettuato in modo automatico monitorando il valore di pH: quando il valore di quest'ultimo aumenta di 0.1 unità rispetto al valore di set point (6.95), viene addizionato un quantitativo di soluzione di lattosio e di solfato di magnesio tale da riportare la concentrazione di lattosio a 10 g l⁻¹ [57]. Queste addizioni determinano l'aumento del volume di fermentazione da 1.3 l iniziali a 2.3 l finali. Per ovviare a questo problema, gli autori hanno previsto l'utilizzo della membrana esterna per la separazione ed il ricircolo della biomassa, precedentemente descritta; il volume di esercizio del bioreattore viene mantenuto costante utilizzando una portata di terreno di coltura "esausto" rimosso, pari a quella del terreno fresco alimentato.

Come mostrato in tabella 5.2, la produttività risultante con questa tecnica fed-batch risulta superiore a quella ottenuta con l'utilizzo di *Hydrogenophaga pseudoflava* riportata nel paragrafo 5.1.

Utilizzando *rE. coli*, è stato evidenziato come la concentrazione ottimale di biomassa a cui iniziare il ricircolo della stessa è di 70÷80 g l⁻¹, a cui corrisponde una concentrazione di biomassa residua di 40÷50 g l⁻¹ [58]. Un ulteriore vantaggio è rappresentato dal fatto che non si verificano eventuali effetti

di inibizione della biomassa, derivanti dalla presenza di sostanze prodotte durante il metabolismo cellulare: da questo deriva il vantaggio di non dover sostituire l'intero terreno di coltura [58].

Tabella 5.2: parametri della fermentazione condotta con rEscherichia coli ($Y_{PHA/X}$: resa massica riferita alla biomassa) [57].

Biomassa [g·l ⁻¹]	PHA [g·l ⁻¹]	$Y_{PHA/X}$ % [g _{PHA} ·g _{biomassa} ⁻¹]	Durata Fermentazione [h]	Produttività [g _{PHA} ·l ⁻¹ ·h ⁻¹]
194	168	87	36.5	4.6

Nel caso dello scale-up a 10 l, la concentrazione iniziale di lattosio viene mantenuta pari a 20 g l⁻¹, mentre l'aggiunta del lattosio e del solfato di magnesio eptaidrato viene effettuata impiegando soluzioni di concentrazione rispettivamente di 200 e di 4.5 g l⁻¹; tutti gli altri parametri (ad eccezione dell'assenza del ricircolo della biomassa grazie alla separazione mediante membrana esterna), come la temperatura, il pH e la concentrazione di ossigeno disciolto, sono stati mantenuti identici rispetto alla prova con volume di lavoro pari a 2.3 l.

Al fine di studiare le condizioni di fermentazione da implementare successivamente nello scale-up a 150 l, in quello da 10 litri sono state testate due strategie [59]:

1. Dopo l'esaurimento del substrato a cui corrisponde un aumento di pH, la concentrazione del lattosio viene riportata alla concentrazione iniziale di 20 g l⁻¹.
2. Durante la fase di crescita, dove la concentrazione della biomassa è inferiore a 12 g l⁻¹, la corrente alimentata riporta la concentrazione di lattosio a soli 2 g l⁻¹; solo quando la concentrazione di biomassa supera i 12 g l⁻¹, la concentrazione del substrato, a seguito di ogni aggiunta, viene riportata a 20 g l⁻¹.

Le due strategie implementate in questi lavori scientifici, mostrano dei risultati alquanto diversi come riepilogato nella seguente tabella 5.3.

Tabella 5.3: parametri della fermentazione condotta con rEscherichia coli secondo due strategie di fermentazione diverse (volume di fermentazione 10 l) [59].

Fermentazione	Biomassa [g·l ⁻¹]	PHA [g·l ⁻¹]	$Y_{PHA/X}$ % [g _{PHA} ·g _{biomassa} ⁻¹]	Durata Fermentazione [h]	Produttività [g _{PHA} ·l ⁻¹ ·h ⁻¹]
1	14.5	10.33	71	20	0.52
2	51	35.5	70	26	1.36

Nella fermentazione 1, dove con il fed-batch la concentrazione di lattosio viene ripristinata subito ad una concentrazione di 20 g l⁻¹, si ha la sintesi del polimero a scapito di una bassa concentrazione di biomassa; tale situazione con una fase di crescita esponenziale della biomassa piuttosto limitata, ha come risultato, da un lato elevate rese di polimero rispetto alla biomassa ($Y_{PHA/X}$), ma dall'altro basse concentrazioni finali di polimero.

Nella fermentazione 2, durante la fase di crescita esponenziale, la concentrazione di lattosio viene mantenuta ad un valore di 2 g l⁻¹, in maniera tale da evitare un accumulo precoce di polimero favorendo la crescita della biomassa. Nel momento in cui la concentrazione di biomassa supera i 10

g l^{-1} , il lattosio viene alimentato ad una portata più elevata in modo da innalzarne la concentrazione nella brodocoltura da 2 a 20 g l^{-1}

Tale strategia attuata nella fermentazione 2, porta a risultati nettamente migliori rispetto alla fermentazione 1 (tabella 5.3).

Infine, come mostrato in tabella 5.4, l'efficacia della strategia adottata nella fermentazione 2, trova conferma anche quando viene effettuato lo scale-up in un reattore da 150 l [59].

*Tabella 5.4: parametri della fermentazione condotta con *rEscherichia coli* (volume di fermentazione 150 l) [59].*

Biomassa [$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$]	PHA [$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$]	$Y_{\text{PHA}/X}$ % [$\text{g}_{\text{PHA}} \cdot \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$]	Durata Fermentazione [h]	Produttività [$\text{g}_{\text{PHA}} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]
30	20	67	25	0.8

5.3 Fermentazione con *Thermus thermophilus*

Questo batterio, di tipo termofilo, trova il proprio ambiente ideale di crescita ad una temperatura compresa nell'intervallo $50 \div 85 \text{ }^{\circ}\text{C}$, con valori ottimali prossimi a $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$, mentre il pH della fermentazione viene regolato a 7.2; in questo caso il nutriente limitante è rappresentato dalla fonte di azoto, somministrato sotto forma di solfato d'ammonio ad una concentrazione di 4 g l^{-1} [60]. Gli altri due parametri oggetto di studio, sono la concentrazione della fonte di fosforo e quella del substrato.

Questo batterio è in grado di sintetizzare il polimero partendo da diverse concentrazioni sia di lattosio puro che di siero di latte deproteinizzato. È stato osservato che all'aumentare della concentrazione di substrato, la biomassa raggiunge la fase stazionaria di crescita a tempi sempre maggiori. Una diversa concentrazione di substrato, a parità degli altri parametri di fermentazione, determina cinetiche e rese diverse per quanto riguarda la sintesi di polimero, come desumibile dalla tabella 5.5.

I dati raccolti in questa tabella mostrano come la massima concentrazione di biomassa sia ottenuta partendo da una concentrazione di substrato pari a 24 g l^{-1} , a cui, però, non corrisponde la massima concentrazione di polimero e quindi, la massima produttività, che viene invece ottenuta con una concentrazione di lattosio pari a 12 g l^{-1} . Questi risultati sono stati ottenuti alla concentrazione ottimale della fonte di azoto (costituita dal solfato d'ammonio) pari a 4 g l^{-1} [60].

*Tabella 5.5: effetto della concentrazione del substrato sulla crescita della biomassa e sulla concentrazione di polimero ottenuto nella fermentazione con *Thermus thermophilus* [62].*

Lattosio [$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$]	Biomassa [$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$]	PHA [$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$]	$Y_{\text{PHA}/X}$ [$\text{g}_{\text{PHA}} \cdot \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$] %	Durata Fermentazione [h]	Produttività [$\text{g}_{\text{PHA}} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]
3	0.83	0.11	13	24	0.005
6	1.07	0.25	23	24	0.01
12	1.60	0.57	36	24	0.024
24	2.09	0.51	24	24	0.021
45	1.92	0.29	15	24	0.012

Oltre alla concentrazione del substrato e dell'azoto, è stata investigata anche la concentrazione ottimale di fosforo [61].

Partendo da una concentrazione di lattosio pari a 12 g l^{-1} , e da concentrazioni di fosfato diverse comprese nell'intervallo $0\div 50 \text{ mM}$, si ottengono valori nettamente differenti per quanto riguarda sia la concentrazione di polimero sia della biomassa. I massimi valori di concentrazione della biomassa ottenuti in 48 ore di fermentazione, sono pari a 1.38 g l^{-1} e 1.44 g l^{-1} , corrispondenti a concentrazioni di fosfato pari a 5 e 10 mM rispettivamente.

Il consumo di lattosio, a tutte le concentrazioni di fosforo testate, è simile, mentre l'esaurimento si raggiunge dopo circa 24 ore.

È stato osservato che aumentando la concentrazione di fosforo, aumenta anche quella di PHA prodotto: la fermentazione con una concentrazione iniziale di fosfato pari a 50 mM permette di ottenere sia la più alta concentrazione di polimero (0.268 g l^{-1} a 24 ore), sia la più alta resa riferita alla biomassa ($Y_{\text{PHA/X}}=34 \%$). Appare quindi ovvio come la concentrazione di fosfato sia fondamentale ai fini della produttività e, quindi, del costo finale del polimero [61].

A parità di concentrazione iniziale di lattosio, 12 g l^{-1} , con una concentrazione iniziale di fosfato di 50 mM si ottiene la massima produttività, pari a $0.011 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

5.4 Fermentazione con *Methylobacterium* ZP 24

Questo batterio utilizza il lattosio, come substrato di crescita, ad una concentrazione ottimale di 12 g l^{-1} ; il nutriente limitante è costituito dalla fonte di azoto, somministrata sotto forma di solfato d'ammonio, alla concentrazione di 2.36 g l^{-1} . Le condizioni ottimali di crescita prevedono una temperatura di 30°C ed un pH di 7, mentre la concentrazione ottimale di ossigeno disciolto è pari al 30 % del valore di saturazione con aria. La fermentazione, di tipo fed-batch, viene effettuata sostituendo il 20 % del volume iniziale della coltura, impiegando un terreno sintetico addizionato di lattosio, al posto del siero di latte deproteinizzato [62].

La modalità di fermentazione fed-batch viene implementata per aumentare sia la concentrazione di polimero, sia la produttività; le fasi di coltura sono tre:

1. La prima, di tipo batch, viene attuata fino al raggiungimento della fase stazionaria di crescita della biomassa e della massima concentrazione di PHA, monitorando il consumo del substrato e della fonte di azoto.
2. La seconda, durante la quale viene alimentata una corrente di lattosio e solfato d'ammonio (20 % del volume iniziale), le cui concentrazioni sono pari a quelle misurate al raggiungimento della fase stazionaria della biomassa.
3. La terza, dopo aver innescato la fermentazione fed-batch, viene condotta sino ad un ulteriore aumento della concentrazione di polimero.

La filosofia operativa consiste nel mantenere la concentrazione delle fonti di carbonio e di azoto ai valori per cui si ha la massima velocità di sintesi, estendendo di conseguenza la fase di accumulo del polimero.

Questo microrganismo raggiunge la fase stazionaria di crescita dopo circa 30 ore, quando il rapporto tra la concentrazione di lattosio e solfato d'ammonio è pari a 5 (pari ad un rapporto C/N 10) [62]. Mantenendo costante questo parametro, sono state formulate quattro differenti correnti da utilizzare nella fase fed-batch. Come osservabile dai risultati riassunti in tabella 5.6, la corrente a cui corrisponde una maggiore concentrazione di polimero, è quella denominata C2, alimentata dopo 30 ore. È possibile inoltre notare come si abbia un incremento della concentrazione del polimero pari a

circa il 50 %, passando dalla fase di fermentazione batch a quella fed-batch (0.454 g l⁻¹ contro 0.772 g l⁻¹).

Appare evidente come la sintesi di polimero sia innescata da una limitazione della fonte di azoto: delle tre correnti a cui corrisponde la maggiore concentrazione di polimero, C2, C3 e C4, la C2 è quella formulata con il minor quantitativo di solfato d'ammonio [62].

Tabella 5.6: composizione delle correnti alimentate e relativa concentrazione di polimero ottenuta [62].

Alimentazione	C₁₂H₂₂O₁₁/ (NH₄)₂SO₄	Lattosio [g*l⁻¹]	(NH₄)₂SO₄ [g*l⁻¹]	PHA [g*l⁻¹]	Tempo [h]	Produttività [g_{PHA}*l⁻¹*h⁻¹]
Batch	-	-	-	0.454	48	0.009
C1	5:1	0.5	0.1	0.486	48	0.010
C2	5:1	1.0	0.2	0.772	48	0.016
C3	5:1	2.0	0.4	0.623	48	0.013
C4	5:1	1.0	0.33	0.592	48	0.012

Un altro parametro considerato nell'ottica dell'ottimizzazione della fermentazione, è la concentrazione di ossigeno disciolto: la soluzione migliore riscontrata, è quella che prevede una concentrazione costante nel tempo pari al 30% rispetto al valore di saturazione con aria [62]. Al contrario, come visto nel paragrafo 5.2, nel caso in cui si utilizzi *rE. coli*, la soluzione migliore consiste in una diminuzione graduale della concentrazione di O₂; questa differenza può essere giustificata dal fatto che nel caso della fermentazione con *rE. coli* si aveva una netta distinzione tra la fase di crescita della biomassa e quella di accumulo del polimero [63], al contrario, con *Methylobacterium ZP 24*, questa differenza non è apprezzabile.

6. Estrazione dei PHA

Come definito nel paragrafo 2.1, i PHA costituiscono un prodotto di natura intracellulare, pertanto la loro estrazione dalle cellule dei microrganismi costituisce una problematica importante sia dal punto di vista tecnico sia da quello economico.

Il processo di estrazione prevede due fasi:

- Lisi cellulare.
- Estrazione con solvente del polimero rilasciato.

Nel processo di lisi cellulare i metodi adottati devono essere in grado di agire sia sulla membrana esterna sia sulla parete cellulare e favorire il rilascio del polimero.

Nel processo di estrazione con solvente, la scelta di quest'ultimo è legata al tipo di PHA da estrarre: nel caso di catene laterali corte come per il PHB e PHBV, in letteratura, si predilige l'utilizzo di solventi organici clorurati come il cloroformio, mentre nel caso di catene laterali lunghe, il solvente più utilizzato è l'acetone [64].

Nella maggior parte dei casi, prima del processo di estrazione si rende necessario un pretrattamento della biomassa, necessario per allontanare eventuali sostanze contaminanti (come ad esempio nutrienti residui della brodocoltura) e per favorire la successiva fase di lisi cellulare. Oltre a questi pretrattamenti, solitamente, sono necessari processi di purificazione del polimero operati successivamente all'estrazione.

6.1 Processi di pretrattamento

A seguito della separazione della biomassa dalla brodocoltura, solitamente, prima di procedere alle operazioni successive, si opera una sua concentrazione nel range $5 \div 85 \text{ g l}^{-1}$. A questa operazione segue il pretrattamento, le tipologie più comuni sono tre:

- Riscaldamento della biomassa che causa la denaturazione delle proteine presenti nel doppio strato lipidico, intaccando la stabilità strutturale della parete cellulare.
- Applicazione di soluzioni ipertoniche di cloruro di sodio, in grado di provocare la disidratazione della biomassa.
- Congelamento della biomassa (-20°C) per facilitare la successiva estrazione con Ipoclorito di sodio (NaOCl).

6.2 Estrazione con solvente

Uno dei più classici metodi di estrazione è costituito dall'uso di solventi per il recupero dei PHA. Il solvente svolge una duplice azione:

- Agisce sulla permeabilità della membrana cellulare.
- Solubilizza il polimero.

I primi solventi utilizzati, sono stati quelli organici clorurati come il cloroformio, l'1,2-dicloroetano, il clorometano; in questi casi il recupero del polimero può avvenire attraverso l'evaporazione del solvente o per precipitazione mediante l'aggiunta di un non solvente.

Generalmente, il recupero del polimero tramite un'estrazione diretta con solvente se da un lato consente di raggiungere purezze elevate ($> 97\%$), dall'altro evidenzia una resa di recupero deficitaria ($\leq 90\%$) [65].

I solventi ed i relativi non-solventi più comuni utilizzati per il recupero dei PHA sono riassunti in tabella 6.1.

Tabella 6.1: solventi e non-solventi più comuni utilizzati per il recupero dei PHA [66].

Solventi più comuni per i PHA	Non-solventi più comuni per i PHA
Cloroformio	Acqua
1,2 propilen-carbonato	Metanolo, Acetone
Diclorometano	Metanolo
Anidride acetica	Etanolo
Idrossido di sodio 1M	1-propanolo
Di-Tri-Tetracloroetano	Benzene
Trifluoroetanolo	Cicloesano
Acido acetico	Ipoclorito di sodio
Alcoli con >3 atomi di C	Dietil-etere
Dimetilformammide	Esano
Trioleina	Butilacetato
Acetone	Etilacetato

6.3 Estrazione con ipoclorito di sodio

L'utilizzo di questo reagente, si rende necessario quando si richiede un elevato grado di purezza (~ 99%) [65]; tuttavia il suo impiego risulta limitato, in quanto la sua natura di forte ossidante causa la degradazione del polimero estratto dal punto di vista del peso molecolare medio ponderale, che può essere ridotto fino al 50 % di quello originario. Oltre che dal tipo di solvente, il peso molecolare del polimero estratto, può essere influenzato dalla sua concentrazione e dalla temperatura a cui viene condotto il trattamento.

6.4 Estrazione con ipoclorito di sodio e cloroformio

L'abbinamento del cloroformio all'ipoclorito di sodio si rende necessario per garantire, contemporaneamente, oltre all'elevata purezza del polimero, l'inibizione di eventuali fenomeni degradativi derivanti dall'azione ossidativa esercitata dall'ipoclorito sul polimero.

Durante questo tipo di estrazione vengono a formarsi tre fasi:

- Superiore: costituita dalla soluzione di ipoclorito.
- Intermedia: contenente il materiale cellulare.
- Inferiore: costituita dalla soluzione cloroformio-PHA, di densità maggiore.

Dopo aver separato la terza fase, costituita dal cloroformio in cui è sciolto il polimero, si recupera quest'ultimo tramite evaporazione del solvente o attraverso la precipitazione con aggiunta di un non-solvente.

Il vantaggio di questa tecnica, è quello di ridurre significativamente le problematiche legate all'utilizzo del solo ipoclorito: l'ipoclorito consente una efficace rottura della cellula, mentre la fase cloroformio solubilizza il polimero preservandolo dai fenomeni di degradazione.

Le condizioni operative ottimali indicate in letteratura sono [67]:

- Concentrazione di ipoclorito di sodio del 30 % (w/v).
- Rapporto in volume pari a 1:1 tra cloroformio e ipoclorito di sodio.
- Concentrazione della biomassa del 4 % (w/v).
- Temperatura di lavoro pari a 30 °C.
- Agitazione per 90 minuti.

Occorre tuttavia notare come l'utilizzo di questo metodo richieda una notevole quantità di cloroformio e di ipoclorito di sodio; ne deriva che eventuali applicazioni in campo industriale hanno come primo problema quello del riutilizzo e della purificazione di queste sostanze all'interno del processo produttivo per contenere i costi di lavorazione e, come secondo non trascurabile problema, la pericolosità derivante dall'impiego di un solvente tossico come il cloroformio.

6.5 Purificazione

Solitamente, a seguito dell'estrazione, è necessario attuare una purificazione per aumentare la purezza finale del polimero estratto, che potrebbe contenere contaminanti rappresentati da lipidi, proteine, DNA etc.; le impurità più frequenti riscontrate nei PHA sono riassunte in tabella 6.2.

La purificazione può prevedere l'utilizzo di soluzioni alcoliche, ozono oppure di perossido di idrogeno (che tuttavia può causare una diminuzione del peso molecolare medio ponderale del polimero ed è, quindi, da evitare), in grado di solubilizzare le impurità presenti.

Tabella 6.2: contaminanti più comuni dei PHA.

Contaminante	Tipo di estrazione	Microrganismo	Rimozione contaminante	Riferimento
Lipidi	Rottura meccanica dell'NPCM+centrifugazione Digestione chimica o enzimatica dell'NPCM Estrazione con solventi polari	Tutti i ceppi	Sgrassamento continuo o ripetuto prima dell'estrazione dei PHA	[68]
Proteine	Rottura meccanica dell'NPCM+centrifugazione Digestione chimica dell'NPCM Residui di enzimi idrolitici da digestione enzimatica	Tutti i ceppi	Applicazione di proteasi	[69]
Endotossine (LPS)	Rottura meccanica dell'NPCM+centrifugazione Bassa concentrazione usando estrazione solvente-antisolvente, specialmente utilizzando solventi unipolari	Gram-negativi	Dissoluzione ripetuta con solventi unipolari e precipitazione; Post trattamento con O ₃ , H ₂ O ₂ , ClO ⁻ o NaOH	[70]
DNA	Rottura meccanica dell'NPCM+centrifugazione Digestione chimica dell'NPCM	Tutti i ceppi	Addizione di nucleasi; espressione di nucleasi attraverso ingegnerizzazione del ceppo impiegato	[71]

Ipoclorito	Digestione chimica dell'NPCM utilizzando ipoclorito di sodio	Tutti i ceppi	Dissoluzione del polimero in cloroformio	[72]
Agenti antischiuma	Estrazione cloroformio-etanolo	Tutti i ceppi coltivati con addizione di antischiuma in eccesso	-	[73]

7. Scopo del lavoro

Attualmente, la produzione industriale dei PHA, per via fermentativa, rappresenta una sfida dal punto di vista della sostenibilità economica del processo. Il costo ridotto delle plastiche di origine petrolchimica, le rende ancora preferibili sul mercato rispetto ai biopolimeri, nonostante i problemi ambientali legati al loro utilizzo.

Il lavoro svolto si inserisce in questo contesto ed ha come obiettivo lo studio di un processo economicamente competitivo per la produzione dei PHA.

La soluzione proposta prevede l'impiego, in fermentazione, di un substrato a basso costo, costituito dai sottoprodotti dell'industria casearia: il siero di latte e la scotta.

Questi sottoprodotti a loro volta costituiscono una voce di costo nei processi di produzione a causa della necessità del loro smaltimento. Il loro utilizzo rappresenta quindi una duplice utilità: da un lato consentirebbe all'industria casearia di eliminarne il costo di smaltimento, dall'altro, a seguito della valorizzazione delle frazioni nobili di questi sottoprodotti (lipidi, proteine e lattosio), consentirebbe di trarne un profitto.

I costituenti del siero come i lipidi possono essere separati attraverso un processo di precipitazione, mentre le proteine attraverso un processo a membrana, che ne consenta il recupero e la purificazione; il lattosio, invece, costituisce il substrato per la produzione di PHA per via fermentativa impiegando un consorzio microbico.

Quest'ultima scelta è stata fatta nell'ottica di un ulteriore contenimento dei costi in quanto la crescita di una biomassa mista non necessita di condizioni di sterilità stringenti e richiede quindi processi di up-stream, fermentazione e down-stream più semplici rispetto ad un eventuale impiego di biomassa pura.

8. Materiali e Metodi

8.1 Terreni di coltura

Le colture utilizzate in questo lavoro di tesi sono di tipo liquido con biomassa sospesa. Durante le prove sperimentali in beuta ed in reattore, sono stati utilizzati diversi tipi di terreno di coltura:

1. Il terreno *Khardenavis* [74] contenente quale fonte di carbonio acido acetico, impiegato per le colture di arricchimento, costituenti l'inoculo delle successive colture di produzione dei PHA.
2. Il siero di latte commerciale Molkolac® (Milei GmbH), addizionato della componente salina del terreno *Khardenavis*, impiegato per le fermentazioni preliminari in reattore, su scala di laboratorio.
3. La scotta proveniente dal processo di produzione della “ricotta”, impiegata per le fermentazioni in reattore su scala di laboratorio e su scala pilota.
4. Il siero di latte proveniente dal processo di caseificazione del formaggio “toma”, impiegato per le fermentazioni in reattore su scala di laboratorio.

8.2 Terreno *Khardenavis* con fonte di carbonio acido acetico

Il terreno di coltura *Khardenavis*, la cui composizione è riportata in tabella 8.1, è stato utilizzato tal quale per allestire le colture definite di “arricchimento”, essendo selettivo nei confronti dei batteri PHA-produttori.

Tabella 8.1: composizione del terreno *Khardenavis* [74].

Terreno <i>Khardenavis</i>	
Costituente	Concentrazione [g/l]
CH ₃ COOH	20
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.754
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.4
Trace Elements	1 ml
Trace Elements	
Costituente	Concentrazione [g/l]
Na ₂ SO ₄	25
FeSO ₄ · 7H ₂ O	25
MnSO ₄ · 4H ₂ O	4.06
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	4.40
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.79
CaCl ₂ · 2H ₂ O	73.4
pH=7.0 – 7.2	

Questo terreno contiene, quale fonte di azoto, il fosfato acido di ammonio, mentre alla fonte di fosforo contribuiscono sia il fosfato acido di ammonio, che il fosfato acido di potassio. Il rapporto C/N risulta essere di 50 mentre il rapporto C/P è pari a 22.6.

La preparazione del terreno di coltura avviene in primo luogo solubilizzando i sali che lo costituiscono, in secondo luogo aggiungendo la fonte di carbonio costituita dall'acido acetico, ed in terzo luogo procedendo con la correzione del pH a 7 ± 0.2 mediante idrossido di sodio.

8.3 Siero di latte commerciale Molkolac®, addizionato dei sali del terreno *Khardenavis*

Per allestire le colture preliminari in reattore, è stato utilizzato un siero di latte commerciale in polvere, il Molkolac® (prodotto da Milei GmbH) ottenuto mediante un processo di ultrafiltrazione abbinato alla tecnica dello spray-drying; la composizione di questo prodotto è riassunta in tabella 8.2. È stata effettuata questa scelta poiché i sieri provenienti dall'industria casearia presentano una certa variabilità dal punto di vista della composizione chimica, sia a causa del processo di caseificazione sia a causa della stagionalità delle lavorazioni, tale variabilità non consentirebbe, quindi, uno studio preliminare adeguato, in grado di fornire indicazioni certe durante tutta l'evoluzione del processo fermentativo, che essendo un processo biologico, presenta già di per sé una certa variabilità intrinseca.

Tabella 8.2: composizione del siero di latte commerciale Molkolac®.

Proprietà fisiche	
Densità	750 ± 50 g/l
pH	6.4 ± 0.3
Composizione media [%] p/p	
Lattosio	83
Proteine	4
Ceneri	6
Grassi	1
Umidità	6

La preparazione del terreno avviene solubilizzando in acqua distillata il siero di latte in polvere, in maniera tale da ottenere una soluzione che abbia una concentrazione di lattosio pari a 100 g l⁻¹, tale soluzione sarà poi diluita per ottenere la concentrazione finale desiderata in coltura. La soluzione di Molkolac® così ottenuta, viene sottoposta ad abbattimento del contenuto lipidico e proteico mediante trattamento termico (riscaldamento a 120 °C per 20').

Il liquido, lasciato raffreddare, viene centrifugato (8000 rpm, 10') e successivamente filtrato mediante filtri in acetato di cellulosa di porosità pari a 0.45 µm. La centrifugazione e la microfiltrazione si rendono necessarie per separare i lipidi e le proteine precipitate; queste due operazioni non pregiudicano la concentrazione di lattosio che rimane costante durante i tre steps di riscaldamento-centrifugazione-microfiltrazione [75]. La soluzione ottenuta viene miscelata al terreno di coltura direttamente in reattore al momento dell'allestimento delle colture.

Il volume di soluzione Molkolac® addizionata ai sali del terreno *Khardenavis* dipende dalla concentrazione di substrato finale desiderata; il quantitativo di fosfato acido di ammonio viene dosato in relazione alla soluzione di Molkolac®, in maniera da mantenere il rapporto C/N iniziale di 50 come nel caso del terreno *Khardenavis* con acido acetico.

8.4 Siero di latte e scotta

Il siero di latte costituisce il sottoprodotto di natura liquida che si separa dalla cagliata durante la caseificazione, la sua composizione indicativa è riportata in tabella 8.3.

Le caratteristiche chimico-fisiche e microbiologiche del siero possono essere variabili, in rapporto soprattutto alla tipologia di prodotto e alle dimensioni dell'industria casearia [77].

Tabella 8.3: composizione media del siero di latte [39, 76].

Parametri	
Lattosio [g/l]	45 (40÷45)
Proteine [g/l]	7.5 (8.5÷9.9)
Grassi [g/l]	4 (5÷8)
Ceneri [g/l]	0.7
Vitamine [g/l]	12
Acidi organici [g/l]	n.d. (siero dolce) 1.5 (siero acido)
pH	5.8-6 (siero dolce) 4.9-5.5 (siero acido)
Sali minerali [g/l]	3.5
COD [mg/l]	50000

Esso contiene tutti gli elementi solubili del latte che non hanno partecipato alla coagulazione:

- β -lattoglobuline¹
- α -lattoglobuline²
- Glicomacropeptidi³
- Immunoglobuline
- BSA
- Lattoferrina⁴
- Lattoperossidasi
- Lisozima
- Lattosio
- Vitamine
- Sali minerali
- Grassi

La composizione del siero è funzione di vari parametri, come la specie allevata, l'alimentazione, la razza, la stagione di produzione del latte, la fase di lattazione, il tipo di formaggio e il tipo di lavorazione utilizzata per produrlo [77]. A seconda della tipologia di lavorazione adottata, il siero si può distinguere in dolce (bassa acidità, pH > 5.6) oppure acido (pH < 5.1).

A causa della variabilità dei parametri che la influenzano, la composizione del siero presenta differenze in conseguenza della tecnologia di caseificazione impiegata; queste sono da imputare al sistema impiegato per la coagulazione della caseina e dal livello raggiunto dalla fermentazione del lattosio. Il tenore di calcio e fosforo nel siero dipende, ad esempio, dal tipo di coagulazione del latte. Il processo di caseificazione influenza anche il tenore di grasso e di acido lattico; infatti il siero sarà più ricco di questi elementi se proveniente da lavorazioni che hanno visto impiegato latte intero, specialmente se a cottura molto spinta. [77]

La scotta è il sottoprodotto di natura liquida ottenuto dal processo di produzione della ricotta; questo processo consiste nella coagulazione termica (80-90 °C) delle sieroproteine presenti nel siero

¹ E' la proteina presente in quantità maggiore nel siero di latte (50-55% delle proteine presenti) e costituisce una eccellente fonte di aminoacidi essenziali.

² E' la seconda proteina per quantità presente nel siero di latte (20-25% delle proteine presenti) ed è ricca di triptofano, un aminoacido essenziale.

³ Sono peptidi derivanti dalla caseina che si formano durante il processo di produzione del formaggio, e costituiscono circa lo 0-15% delle proteine presenti nel siero di latte.

⁴ E' una glicoproteina globulare che costituisce circa l'1-2% del carico proteico del siero; inibisce la crescita di batteri e funghi.

di latte. La composizione media della scotta è quindi legata alla composizione del siero, di conseguenza è soggetta anch'essa a una certa variabilità.

La scotta si differenzia dal siero qualitativamente per la colorazione (giallo paglierino nel caso della scotta e bianco lattiginoso nel caso del siero), per cui in genere la distinzione tra i due sottoprodotti è agevole.

Tabella 8.4: composizione media della scotta [39, 76].

Parametri	
Lattosio [g/l]	40 (38÷50)
Proteine [g/l]	1.5 (2.8÷4.6)
Grassi [g/l]	2 (0.4÷1.4)
Ceneri [g/l]	1
Vitamine [g/l]	-
Acidi organici [g/l]	2
pH	5.6-6.2
Sali minerali [g/l]	4.8
COD [mg/l]	25000

La composizione media della scotta è riportata in tabella 8.4; come è possibile osservare, si tratta di un sottoprodotto più povero dal punto di vista nutritivo rispetto al siero, infatti la concentrazione proteica risulta di un quinto, mentre possiede una concentrazione di sali più elevata (4.8 g/l contro 3.5 g/l del siero di latte) e contiene ancora molti solidi sospesi e molti grassi.

La presenza nel siero, ed in misura minore nella scotta, di lipidi, rende necessario adottare un processo di pre-trattamento atto ad abbatterne il contenuto; a tale scopo è stato condotto su entrambe le matrici, un processo termo-chimico e di separazione, costituito dalla precipitazione termocalcica abbinata alla microfiltrazione, descritti nei paragrafi successivi.

Per quanto riguarda il contenuto proteico di siero e scotta, nell'ottica di valorizzare questa frazione, è stato adottato un processo di ultrafiltrazione tangenziale successivo alla microfiltrazione, che consente di separare un retentato concentrato, costituito dalle proteine (destinate a successivi trattamenti di purificazione), ed un permeato che costituisce il terreno delle fermentazioni per la produzione di PHA.

La composizione del siero di latte e della scotta impiegati in questo lavoro di tesi sono riportati in tabella 8.5, in particolare, per quanto riguarda il siero di latte, è stato impiegato quello derivante dalla caseificazione del formaggio "toma".

Al fine del loro utilizzo, il siero di latte e la scotta sono stati pre-trattati mediante i processi di precipitazione termo-calcica, microfiltrazione ed ultrafiltrazione, che come già accennato, saranno descritti nei paragrafi successivi.

Ai fini dello studio sperimentale, la scotta è stata la prima matrice testata, in particolare il terreno per le fermentazioni è stato formulato impiegando:

- Permeato ultrafiltrato a 30 kDa di scotta, diluito al 50 % (lattosio 20 g/l).
- Permeato ultrafiltrato a 30 kDa di scotta, non diluito (lattosio 40 g/l).
- Permeato ultrafiltrato a 30 kDa di scotta, non diluito e addizionato di cloruro d'ammonio (correzione del C/N iniziale a 50).
- Scotta tal quale, non pretrattata.

Tabella 8.5: composizione del siero di latte e della scotta impiegati per allestire le fermentazioni.

MATRICE	Lattosio [g/l]	Acido lattico [g/l]	Ammonio [g/l]	pH
Scotta	(38÷50)	0.28÷0.40	0.01÷0.02	5.4
Siero di toma	(40÷45)	0.02÷0.08	0.07÷0.08	6.7

Per quanto riguarda l'impiego di siero di toma come terreno di coltura, esso ha subito lo stesso pre-trattamento adottato per la scotta, pertanto è stato utilizzato il permeato derivante dall'ultrafiltrazione a 30 kDa. Nei test effettuati, questo tipo di permeato è stato impiegato non diluito, senza addizione di cloruro d'ammonio.

8.5 Pretrattamento di scotta e siero di latte

8.5.1 Precipitazione Termocalcica

La precipitazione termocalcica serve a separare in gran parte i lipidi presenti nel siero di latte e nella scotta, in quanto sono i principali responsabili dei fenomeni di “fouling” delle membrane da ultrafiltrazione.

Il siero di latte e la scotta impiegati, sono stati forniti da un caseificio del torinese e trasportati in laboratorio mantenendoli in condizioni refrigerate a 4 °C. Il liquido alimentato al processo è sempre stato trattato in giornata in modo da limitare il più possibile i fenomeni di degradazione spontanea dovuti alla presenza di biomassa indigena.

Prima di procedere alla precipitazione dei grassi, i fluidi subiscono una filtrazione preliminare su tessuto di nylon con fibre da 20 den in modo da separare eventuali frammenti di cagliata e i solidi sospesi. Successivamente si procede alla precipitazione termocalcica vera e propria.

Questo procedimento si conduce all'interno di un reattore incamiciato del volume nominale di 7 l, impiegando un volume operativo di 5 l; il reattore viene termostato a 55 °C e riempito con il liquido da processare, avviando contemporaneamente il sistema di agitazione (turbina di tipo “Rushton” a pale inclinate). Quando il liquido ha raggiunto la temperatura di 55 °C si procede con l'aggiunta di una soluzione di CaCl₂ (25 g/l) goccia a goccia (portata equivalente di circa 0.8 l/h) fino a raggiungere una concentrazione finale di ioni Ca⁺⁺ di 1.2 g/l (volume precedentemente calcolato). Mantenendo il sistema in agitazione, si procede a dosare una soluzione di NaOH 5 M, sempre goccia a goccia, fino a correggere il pH al valore di 7.7-7.8; il sistema viene mantenuto in queste condizioni per 8', dopodiché, tramite una pompa peristaltica, si procede allo svuotamento del reattore; il liquido ottenuto è versato all'interno di appositi contenitori e raffreddato dapprima con acqua fredda (15 °C) ed in seguito refrigerato a 4 °C.

In questo modo si ottiene la formazione di un precipitato dall'aspetto lattiginoso (la cui quantità è proporzionale alla concentrazione di grassi presenti nel liquido di partenza) e di un surnatante limpido di colore giallo paglierino.

Per separare il precipitato dal surnatante si utilizza una pompa peristaltica in modo da recuperare la massima quantità di surnatante senza causarne la ri-sospensione.

Il surnatante ottenuto in questo modo viene inviato alla successiva fase di microfiltrazione.

8.5.2 Microfiltrazione

La microfiltrazione è un processo di filtrazione che rimuove le particelle solide da un fluido o da un gas facendolo passare attraverso una membrana microporosa; la dimensione media dei pori va

dagli 0.1 ai 100 μm , per cui non si ha alcuna variazione della composizione dei liquidi che circondano la membrana, ma vengono trattenute solo le particelle.

In questo caso la microfiltrazione è atta ad eliminare i sali precipitati ed i lipidi residui presenti nel surnatante della precipitazione termocalcica, che potrebbero creare problemi nella successiva fase di ultrafiltrazione, ostruendo i pori della membrana e causando il blocco del processo.

Per eseguire l'operazione di microfiltrazione sono stati utilizzati filtri a cartuccia tipo Opticap[®] XL della Millipore[®] da 1 μm e da 0.5 μm in successione.

La procedura di lavoro seguita consiste nello svuotare dapprima le cartucce della soluzione conservante (NaOH 0.01 M) e procedere ad un lavaggio con acqua distillata, dopodiché si effettua un avvinamento con il liquido da processare, in maniera da allontanare possibili tracce residue di conservante e di acqua. A questo punto la cartuccia filtrante viene riempita del liquido da trattare avendo cura di effettuare questa operazione con la valvola di ventilazione aperta, dopodiché si procede con la filtrazione vera e propria chiudendo dapprima la valvola di ventilazione, e mettendo in pressione il filtro (1 bar). Il volume utile di questa operazione è di 500 ml, pertanto occorre ripeterla fino all'esaurimento di tutto il volume di prodotto da processare. Le operazioni qui descritte vengono ripetute prima con il filtro da 1 μm e successivamente con quello da 0.5 μm .

Il permeato ottenuto viene alimentato al successivo processo di ultrafiltrazione tangenziale.

Al termine delle operazioni di microfiltrazione si procede al lavaggio delle cartucce dapprima con NaOH 0.5 M a cui viene fatto seguire un lavaggio con acqua distillata; le cartucce vengono poi riempite con una soluzione conservante (NaOH 0.01 M) e stoccate a 4 °C in maniera tale da prevenire la crescita di microrganismi.

8.5.3 Ultrafiltrazione

In questo lavoro è stato impiegato il processo di ultrafiltrazione tangenziale per la separazione ed il recupero delle proteine contenute nel siero di “toma” e nella scotta.

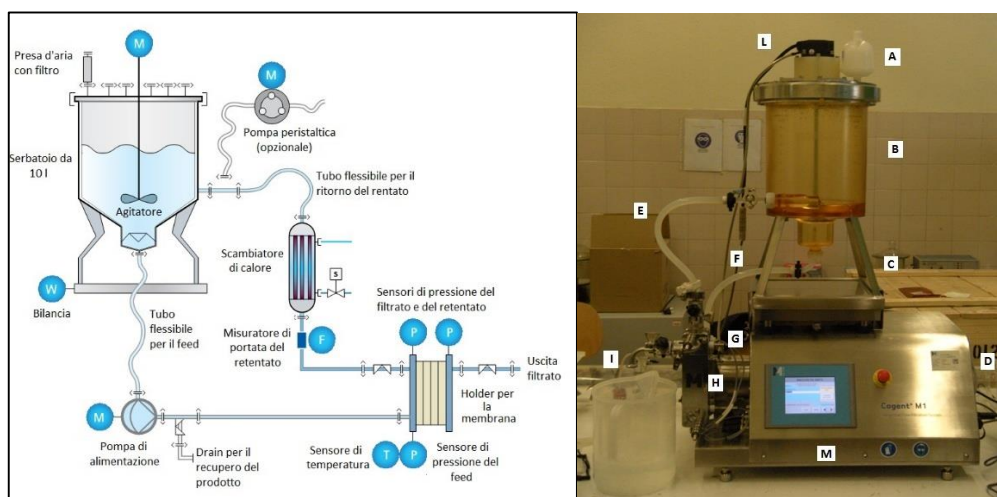


Figura 8.1: schema del Cogent M1[®] Millipore[®].

Lo strumento utilizzato è il Cogent M1[®] (figura 8.1) prodotto da Millipore[®]. Tale apparecchiatura è ideata per lo sviluppo di processi di ultrafiltrazione di sospensioni, su piccola scala e per studi di scale-up; a questo scopo è possibile impiegare diversi tipi di moduli di filtrazione sia per quanto riguarda il materiale di costruzione della membrana, sia per il cut-off, sia per la superficie di filtrazione, infatti, in questo ultimo caso, i moduli sono installabili in parallelo in maniera da poter incrementare la superficie utile di filtrazione da 0.1 m² fino ad 0.5 m².

L'apparecchiatura è costituita dalle seguenti parti:

- A. Filtro dell'aria in acetato di cellulosa di porosità 0.5 μm .
- B. Serbatoio di alimentazione in cui si raccoglie il retentato durante il processo.
- C. Bilancia del serbatoio.
- D. Corpo dell'apparecchiatura.
- E. Tubazione di ritorno del retentato.
- F. Tubazione di alimentazione della membrana filtrante.
- G. Sensori di pressione posti sulla membrana.
- H. Alloggiamento della membrana.
- I. Tubazione di scarico del permeato.
- L. Motore dell'agitatore del serbatoio di alimentazione.

Il processo di ultrafiltrazione batch adottato è costituito da 7 fasi:

1. Avviamento e lavaggio dell'apparecchiatura:
 - Accensione dell'apparecchiatura.
 - Scarico della soluzione conservante (NaOH 0.01 M) presente nel serbatoio e nelle tubazioni.
 - Lavaggio del serbatoio, delle tubazioni e della membrana con acqua distillata.
 - Scarico dell'acqua di lavaggio dall'apposito drenaggio.
 - Taratura del serbatoio a vuoto.
2. Determinazione della permeabilità iniziale della membrana mediante acqua distillata:
 - Immissione di 3 l di acqua distillata nel serbatoio.
 - Concentrazione del retentato fino all'ottenimento di un peso residuo del serbatoio di 0.3 kg. Salvataggio dei dati di processo.
 - Scarico dell'acqua presente nel serbatoio e nelle tubazioni dal drenaggio.
3. Avvinamento ed ultrafiltrazione del prodotto (siero di latte o scotta):
 - Avvinamento delle tubazioni e della membrana mediante immissione nel serbatoio di circa 1 kg di prodotto e concentrazione fino a 0.3 kg; scarico del serbatoio e delle tubazioni dal drenaggio.
 - Carico del prodotto da processare nel serbatoio e concentrazione del retentato fino al valore desiderato. Salvataggio dei dati di processo.
 - Stoccaggio del permeato raccolto a 4 °C.
 - Recupero del retentato presente nel serbatoio per le eventuali successive operazioni di purificazione.
 - Lavaggio del serbatoio e delle tubazioni con acqua distillata e scarico dal drenaggio.
4. Determinazione della permeabilità della membrana post-ultrafiltrazione con acqua distillata:
 - Carico del serbatoio con 3 l di acqua distillata
 - Concentrazione del retentato fino a 0.3 kg.
 - Salvataggio dei dati di processo.
 - Scarico dell'acqua presente nel serbatoio e nelle tubazioni dal drenaggio.
5. Lavaggio della membrana con soda:
 - Carico del serbatoio con 5 l di NaOH 0.5 M.
 - Concentrazione del retentato fino a 0.3 kg.
 - Scarico della soluzione di soda presente nel serbatoio e nelle tubazioni dal drenaggio.
6. Determinazione del recupero della permeabilità post-lavaggio con soda:
 - Carico del serbatoio con 3 l di acqua distillata.
 - Concentrazione del retentato fino a 0.3 Kg.

- Salvataggio dei dati di processo per il confronto con quelli ottenuti prima del lavaggio con soda e la valutazione dell'efficienza di rigenerazione della membrana.
- 7. Messa a riposo dell'apparecchiatura:
 - Riempimento dell'apparecchiatura con 5 l di soluzione conservante.
 - Spegnimento dell'apparecchiatura.

La procedura adottata viene eseguita sia nel caso dell'utilizzo della membrana da ultrafiltrazione da 10 kDa sia per quella da 30 kDa. La membrana che non viene utilizzata nel processo è stoccata a 4 °C in soluzione conservante (NaOH 0.01 M).

8.6 Allestimento delle fermentazioni

8.6.1 Allestimento delle colture in beuta

Per l'allestimento delle colture di arricchimento vengono utilizzate delle beute Erlenmeyer in vetro Pyrex da 500 ml dotate di frangiflutti. La presenza dei frangiflutti assicura un maggior grado di turbolenza del sistema e quindi una miscelazione più efficace. Il volume di coltura, composto da terreno più inoculo, in ogni beuta è mantenuto pari a 200 ml. L'inoculo è costituito da fanghi di caseificio.

Durante il tempo di incubazione le colture vengono poste in una camera termostatica e mantenute al buio, alla temperatura di 30 °C, ed agitate su una piastra oscillante orizzontale avente velocità di rotazione pari a 120 rpm.

Non viene utilizzato alcun sistema di ossigenazione, in quanto l'aerazione superficiale risulta più che sufficiente per la crescita delle colture. Per eliminare eventuali odori che si possono formare durante la fermentazione, l'aria viene catturata e filtrata attraverso un filtro a carboni attivi.

8.6.2 Allestimento delle colture in reattore

Il reattore agitato meccanicamente è il tipo di reattore maggiormente diffuso nel campo delle tecnologie fermentative. Questo genere di fermentatore è costituito da un serbatoio cilindrico al cui centro è montato l'albero dell'agitatore, è dotato di uno sparger, sottostante l'agitatore, che permette la fornitura di aria o di ossigeno nel caso dell'allestimento di colture aerobiche; può essere dotato di un sistema di termostatazione interno (serpentina elettrica riscaldante) o esterno (camicia riempita di un fluido di servizio) e di una serie di bocchelli per l'inserimento di strumenti di misura o per consentire prelievi del brodo di coltura.

Il fermentatore impiegato è il R'ALF[®] prodotto da Bioengineering[®], rappresentato in figura 8.2; esso è composto dai seguenti elementi:

- Un vessel con un volume totale di 6.7 l con corpo cilindrico e fondo sferico.
- Una camicia esterna che consente il controllo della temperatura durante la fermentazione; il riscaldamento o il raffreddamento del fluido di servizio, costituito da acqua, è assicurato da un'apposita unità, dotata di scambiatore di calore a fascio tubiero e pompa di circolazione. La temperatura del fluido è regolata tramite un controllo di tipo PID, con apposite sonde in maniera tale da mantenere costantemente al valore di set-point la temperatura del brodo di fermentazione.
- L'agitazione è assicurata tramite un albero motore montato assialmente sulla testa del reattore. L'albero motore ha una velocità di rotazione compresa tra 0 e 1500 rpm. Su di esso sono montate due turbine radiali di tipo "Rushton" a sei pale. L'agitazione è resa più efficace tramite la presenza di quattro frangiflutti posti sul bordo del vessel.



Figura 8.2: sistema R'ALF® Bioengineering® durante una fermentazione con scotta.

- Qualora fosse prevista l'alimentazione di aria, il sistema è provvisto di uno sparger a 13 fori, l'alimentazione è regolata mediante un controllo PID, mentre la concentrazione di ossigeno disciolto è misurata mediante l'elettrodo polarografico di Clark.
- La movimentazione dei liquidi sia in ingresso al reattore, come le soluzioni per il controllo di pH, sia quelle in uscita, come i prelievi dal liquido di coltura, sono assicurati grazie all'utilizzo di pompe peristaltiche a portata regolabile.
- Il coperchio del reattore è provvisto di una serie di ingressi opportunamente disposti e distanziati tra cui: la sede dell'albero motore ed i vari bocchelli per l'alimentazione di soluzioni acide e basiche (correzione pH), dell'antischiuma e del medium di coltura. Inoltre sono previste opportune aperture per l'introduzione dei vari strumenti di misura quali pH-metro, ossimetro e sonda di misurazione del livello di schiuma, atti a controllare i parametri di processo più importanti: pH, T, pO₂ e formazione della schiuma.
- Il controllo dei vari parametri operativi quali temperatura, pH, pO₂, antischiuma e velocità di rotazione dell'albero motore è gestito, tramite controllori PID, posti sul pannello di controllo. Sullo stesso pannello sono visualizzati, in continuo, i valori attuali e di set-point dei suddetti parametri. I dati ottenuti durante la fermentazione dai vari controllori PID, sono registrati su di un computer interfacciato al fermentatore mediante il programma di dialogo BioLogg® Bioengineering®.

Le fermentazioni sono state allestite mantenendo in ciascuna di esse un volume di inoculo costante, pari al 10 % v/v rispetto al volume totale della coltura; l'inoculo è sempre stato costituito da colture di arricchimento in fase di crescita esponenziale (72 ore). Al fine di standardizzare la concentrazione dell'inoculo, inoltre, si è proceduto a valutarne la densità ottica a 620 nm ed a effettuare opportune diluizioni in maniera che questa fosse compresa nell'intervallo 0.8-1.

La procedura di allestimento delle fermentazioni seguita, prevede l'introduzione del terreno di coltura nel fermentatore, ad eccezione dell'inoculo, dopodiché si provvede all'accensione del sistema di termostatazione, alla taratura del pH-metro, ed al collegamento dei serbatoi di acido (H₂SO₄) e base (NaOH 5 M) alle pompe peristaltiche per la correzione del pH durante la fermentazione, si effettua la taratura dell'ossimetro e si inizia ad aerare il terreno (15'). Non appena le variabili di

temperatura, pH ed ossigeno disciolto hanno raggiunto i valori di set-point, si procede con l'aggiunta dell'inoculo nel reattore. Questo momento viene assunto come punto di inizio della fermentazione (T_0).

A partire dall'inoculo, ad intervalli regolari, vengono effettuati prelievi del brodo di coltura per monitorare i diversi parametri di fermentazione: per ogni punto vengono misurati la densità ottica a 620 nm, il peso secco della biomassa, le concentrazioni di ammonio, lattosio, acido lattico ed acido acetico; nei punti che sono stati individuati come più significativi, inoltre, si effettua l'estrazione dei PHA con il metodo ipoclorito/cloroformio e 1,2 propilen-carbonato, e si determinano il gas e la CO_2 prodotti.

8.7 Determinazione della biomassa: densità ottica, peso secco.

8.7.1 Densità ottica

Il valore di densità ottica è un parametro che fornisce un'indicazione immediata di tipo qualitativo sull'andamento della cinetica di crescita microbica; essa viene misurata attraverso l'uso di uno spettrofotometro HP 8452A diode array, alla lunghezza d'onda di 620 nm.

8.7.2 Peso secco

La concentrazione di biomassa viene determinata come peso secco, mediante il campionamento di un volume definito della brodocoltura che viene centrifugato a 18000 rpm per un tempo pari a 10', alla temperatura di 4 °C. Al termine della centrifugazione, dopo aver allontanato il surnatante, vengono effettuati due cicli di lavaggio del fondello ottenuto, risospingendolo ogni volta con acqua distillata, e centrifugando nelle condizioni sopra citate. Questa operazione di lavaggio permette di allontanare tutte quelle sostanze presenti nel liquido di coltura (sali, nutrienti etc.) che potrebbero alterare il valore finale del peso secco o che, nel caso in cui la biomassa sia impiegata per l'estrazione del polimero, potrebbero solubilizzarsi nel solvente utilizzato per l'estrazione, riducendo la purezza del polimero estratto.

La biomassa ottenuta dopo l'ultimo lavaggio, è posta in un contenitore (di cui è stata misurata la tara), ed inserita in un termostato a 60 °C per almeno 48 ore, fino all'ottenimento di un peso secco costante. Tale temperatura di esercizio assicura l'evaporazione dell'acqua, oltre a mantenere la qualità del polimero preservandolo da eventuali fenomeni ossidativi.

8.8 Determinazione del consumo dei nutrienti e dei prodotti extracellulari di fermentazione (HPLC)

Le concentrazioni di lattosio, di acido lattico e di acido acetico sono state determinate attraverso la tecnica HPLC (High Performance Liquid Chromatography o High Pressure Liquid Chromatography).

Lo strumento utilizzato per questo tipo di misure, prodotto da Kontron Instruments, è stato equipaggiato con una colonna a scambio cationico Agilent Hipler-H di dimensioni 300 x 7.7 mm, la cui fase stazionaria è costituita da particelle di copolimero stirene-divinilbenzene solfonato del diametro di 8 µm.

Le analisi sono state condotte in condizioni isocratiche impiegando una fase mobile costituita da una soluzione di H_2SO_4 0.005 M ad una portata di 0.5 ml/min; la temperatura della colonna è stata mantenuta a 60 °C mediante un termostato; il volume di campione iniettato è stato di 100 µl. Sia i

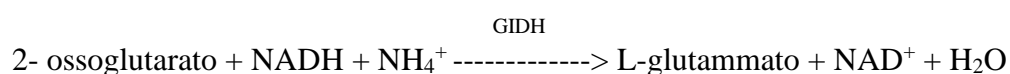
campioni che l'eluente, sono stati microfiltrati con filtri in acetato di cellulosa della porosità di 0.45 µm, prima di essere utilizzati per le analisi.

La determinazione dei composti è stata effettuata mediante l'impiego di un detector ad indice di rifrazione (RI), prodotto da Milton Roy, che misura la variazione dell'indice di rifrazione del solvente causato dal passaggio delle molecole dell'analita.

La concentrazione degli analiti è stata determinata correlando i valori delle aree, ottenute integrando i picchi originati dal segnale elettrico del detector RI, con le concentrazioni di soluzioni a titolo noto di ciascun analita, correlando questi valori mediante una funzione lineare.

8.9 Determinazione dell'ammonio con kit enzimatico

La concentrazione di ammonio presente nel liquido colturale viene determinata per via spettrofotometrica, sfruttando la seguente reazione catalizzata dall'enzima glutammatodeidrogenasi GIDH (kit enzimatico Boehringer Mannheim - Roche n° 10 716 251 035.):



L'analisi si basa sulla determinazione della quantità di NADH ossidata che è equimolare alla quantità di ammonio presente nel campione.

La diminuzione della concentrazione di NADH si calcola dalla differenza di densità ottica misurata, a 340 nm, prima e dopo l'aggiunta dell'enzima. È quindi possibile risalire alla concentrazione di ammonio, tramite la relazione di Lambert Beer.

8.10 Determinazione dei microrganismi PHA produttori: metodo della colorazione con Sudan Black B

L'utilizzo di questa colorazione su colonie di microrganismi inoculate su terreno solido di Agar-Malto in piastre di Petri, consente di discriminare qualitativamente e quantitativamente quelle costituite da microrganismi che non sono in grado di accumulare i PHA (colonie negative non colorate) da quelle in grado di accumularli (colonie positive colorate di blu intenso), e determinare di conseguenza la percentuale di queste ultime.

8.10.1 Inoculo su terreno solido Agar Malto

Il terreno solido Agar Malto, viene preparato a partire da una soluzione (tabella 8.6), a cui viene addizionato l'Agar. La sospensione ottenuta viene autoclavata (al fine di consentire lo scioglimento dell'Agar) a 120 °C per 20' e versata ancora calda in piastre Petri operando in condizioni di sterilità.

Tabella 5.6: composizione del terreno Agar Malto

Componente	Concentrazione [g/l]
Estratto di malto	20
Peptone	2
D-glucosio	20
Agar	20

Un volume pari a 1 ml del campione prelevato dalla fermentazione viene diluito secondo diluizioni seriali con una soluzione salina di NaCl 0.9% sterile, dopodiché si prelevano 100 µl di ciascuna

diluizione e si inoculano le piastre (in due o tre repliche), che vengono poste ad incubare alla temperatura di 30 °C per un tempo necessario alla crescita delle colonie dei microrganismi, in maniera che queste risultino distinguibili e contabili.

8.10.2 Colorazione con Sudan Black B

Il Sudan Black B è un diazo-colorante lisocromo, cioè in grado di legarsi a trigliceridi, lipidi e ad alcune lipoproteine. Queste caratteristiche vengono sfruttate per la colorazione dei microrganismi nei quali si accumulano i PHA sotto forma di inclusioni lipidiche.

La procedura adottata prevede i seguenti passaggi:

- Preparazione di una soluzione al 0.02 % di Sudan Black B in etanolo 97 %.
- Addizione della soluzione nella piastra, in modo tale da ricoprirne totalmente la superficie.
- Incubazione delle piastre chiuse (per evitare l'evaporazione della soluzione alcolica) a temperatura ambiente per 60'.
- Rimozione del colorante.
- Lavaggio delle piastre con etanolo 97 %.
- Rimozione dell'etanolo in eccesso.
- Ripetizione del lavaggio nel caso in cui la piastra risulti ancora parzialmente colorata.
- Conta delle colonie positive e di quelle negative.
- Calcolo della percentuale di colonie PHA produttrici.

8.11 Estrazione dei polioidrossialcanoati

Come riportato nel capitolo 6, poiché i PHA costituiscono un prodotto di natura intracellulare, si rende necessaria, per il loro recupero, la lisi delle cellule batteriche, in maniera da consentire il rilascio del polimero. Tra i vari processi di estrazione riportati in letteratura, ne sono stati scelti in particolare due:

- Il processo di estrazione che sfrutta una miscela di ipoclorito e cloroformio, adottato da Hahn *et al.* 1994 [78].
- Il processo di estrazione che sfrutta il solvente 1,2 propilen-carbonato, adottato da Fiorese *et al.* 2009 [79].

8.11.1 Estrazione secondo il metodo ipoclorito-cloroformio

Questo metodo [79] prevede l'utilizzo di una miscela di ipoclorito di sodio (NaOCl) e cloroformio (CHCl₃) in rapporto 1:1 v/v.

L'azione esplicata dall'ipoclorito di sodio, essendo un forte ossidante, è quella di provocare la lisi cellulare, mentre quella del cloroformio, è di solubilizzare il polimero rilasciato dalle cellule, prevenendone la possibile degradazione ad opera dell'ipoclorito di sodio.

La proporzione fra la biomassa e i volumi dei solventi da utilizzare è la seguente:

1 g di biomassa secca : 25 ml di miscela NaOCl-CHCl₃

La modalità di estrazione adottata è la seguente:

- Porre la biomassa all'interno di beute da 50 ml.
- Aggiungere l'ipoclorito di sodio e immediatamente dopo il cloroformio.
- Chiudere le beute con tappi di vetro a tenuta
- Porre le beute chiuse su un agitatore magnetico (170 rpm), alla temperatura di 30°C, per un tempo di 90'.

- Centrifugare la miscela biomassa- NaOCl - CHCl_3 a 3500 rpm, a temperatura ambiente per 10', in maniera da consentire la separazione delle fasi cloroformio ed ipoclorito di sodio.

Al termine della centrifugazione si possono osservare nella provetta tre fasi (figura 8.3):

- Una fase acquosa superiore, di densità minore, che contiene ipoclorito di sodio.
- Una fase intermedia composta da detriti cellulari.
- Una fase inferiore, di densità maggiore, costituita dal cloroformio nel quale è disciolto il polimero.

La separazione delle fasi è ben distinta grazie alla completa immiscibilità di quella acquosa e di quella organica.

La fase cloroformio, viene recuperata con l'ausilio di una pipetta "Pasteur" in vetro avendo cura di non prelevare i residui di biomassa in prossimità dell'interfaccia biomassa-cloroformio. Proprio per ovviare a tale inconveniente, la soluzione organica recuperata viene sottoposta a filtrazione impiegando filtri in teflon, di porosità pari a $0,45\ \mu\text{m}$.

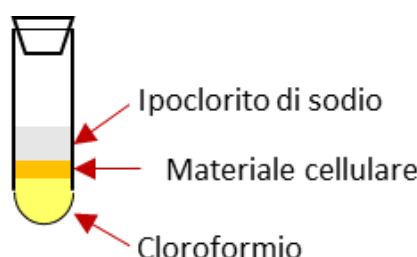


Figura 8.3: separazione delle fasi costituite da ipoclorito di sodio, materiale cellulare e cloroformio al termine della centrifugazione.

Il processo di estrazione con cloroformio viene ripetuto tre volte osservando i seguenti passaggi:

- Nel primo, dopo aver centrifugato ed aver ottenuto la separazione distinta delle tre fasi, viene prelevata la prima aliquota di cloroformio che successivamente viene filtrata.
- Nel secondo, dopo aver aggiunto nella provetta contenente la biomassa un quantitativo di cloroformio uguale a quello prelevato nel primo passaggio, la si agita con l'ausilio di un vortex per consentire l'estrazione del polimero eventualmente ancora a contatto con la biomassa, dopodiché si procede ad una nuova centrifugazione e si recupera la seconda aliquota di cloroformio, ripetendo la filtrazione.
- Nel terzo viene ripetuto quanto previsto al secondo passaggio.

Le tre aliquote di cloroformio così ottenute, vengono versate in tre provette distinte precedentemente tarate, in maniera da poter procedere, dopo l'evaporazione del solvente, alla determinazione gravimetrica mediante pesata su bilancia analitica.

Sfruttando questo procedimento è possibile determinare sia l'efficienza di ciascun passaggio di estrazione, sia la resa di PHA riferita al peso della biomassa secca iniziale.

8.11.2 Estrazione secondo il metodo 1,2-propilen carbonato

Questo metodo di estrazione [73] è stato scelto quale alternativa al metodo che impiega l'ipoclorito ed il cloroformio, poiché a differenza di quest'ultimo, l'1,2-propilen carbonato non è tossico ed il suo recupero risulta essere più agevole, rispetto alla separazione ed alla purificazione dei reagenti ipoclorito di sodio e cloroformio.

A differenza del metodo ipoclorito/cloroformio, la biomassa destinata all'estrazione non viene fatta seccare, ma dopo i lavaggi viene risospesa in acqua distillata, nella misura di 2 g (peso umido)

in 10 ml e congelata a -20 °C. Ai fini dell'estrazione, la biomassa scongelata e separata dall'acqua distillata, mediante centrifugazione a 18000 rpm per 10', viene miscelata all'interno di una beuta con l'1,2-propilen carbonato, riscaldato a 140 °C, secondo il rapporto:

1 g biomassa umida : 13 ml solvente

La sospensione così formata si è posta in agitazione mediante un agitatore magnetico riscaldante a 170 rpm per un tempo di 30', mantenendo la temperatura di 140 °C.

Trascorso questo tempo la sospensione viene filtrata impiegando un filtro in fibra di vetro della porosità di 0.7 µm per separare i detriti cellulari dal solvente. La torta di filtrazione formata, viene lavata con 1,2-propilen carbonato caldo (140 °C) utilizzando un volume pari a quello impiegato per l'estrazione. Le due aliquote di solvente filtrato vengono unite in una beuta e lasciate raffreddare per 24 h, in maniera da consentire lo smiscelamento del polimero.

Al termine delle 24 h il polimero, precipitato, viene separato dal solvente tramite filtrazione impiegando un filtro in fibra di vetro della porosità di 0.7 µm; il polimero depositatosi sulla sua superficie viene recuperato mediante un lavaggio con metanolo e la sospensione formata versata all'interno di provette a fondo conico. La separazione del polimero dal metanolo si ottiene centrifugando la sospensione a 4000 rpm per 10', al termine della quale il surnatante viene recuperato impiegando una pipetta "Pasteur"; il polimero così ottenuto sul fondo della provetta, viene fatto essiccare in stufa a 50 °C per 4 h. L'impiego del metanolo, oltre a consentire il recupero del polimero, costituisce anche uno step di purificazione in quanto eventuali impurità presenti, verrebbero solubilizzate in questo solvente.

8.12 Caratterizzazione dei PHA

La caratterizzazione del polimero accumulato all'interno delle cellule batteriche ed estratto secondo i due metodi precedentemente descritti è stata effettuata sfruttando una tecnica di determinazione di tipo indiretto, che comporta l'analisi dei prodotti derivanti da una "digestione acida" con H₂SO₄, ed una di tipo diretto; queste tecniche sono:

- Analisi dei prodotti di "digestione acida" mediante spettrofotometria UV ed HPLC.
- Spettrometria FTIR.

8.12.1 Digestione acida dei PHA: spettrofotometria UV ed HPLC

Questo metodo risulta specifico per la determinazione dei PHA, ed in questo caso particolare del PHB, in ogni sua forma. Il principio di questa tecnica si basa su due osservazioni: la prima, che il PHB può essere convertito quantitativamente ad acido crotonico attraverso il riscaldamento in acido solforico concentrato, la seconda, che l'acido crotonico può essere individuato attraverso un'analisi spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 235 nm quando il solvente è acido solforico [80].

Il trattamento di digestione acida è stato condotto sia su un PHB standard commercializzato da Sigma-Aldrich (CAS 29435-48-1, codice prodotto 81329) sia sui campioni di polimero estratti a diversi tempi di fermentazione.

A tale scopo sono state preparate soluzioni di PHB standard in acido solforico 97 % (grado analitico) a concentrazioni crescenti nel range 0.625 - 5 mg/l (per rientrare nella linearità della Legge di Lambert-Beer). Le soluzioni, di volume ciascuna pari a 10 ml, sono state poste in tubi pyrex chiusi e riscaldati a 100 °C per 10', dopodiché raffreddate a temperatura ambiente.

Dopo il trattamento i campioni sono stati analizzati mediante spettrofotometria alla lunghezza d'onda di 235 nm in cuvette di quarzo. È stata così costruita la retta di taratura OD 235 - concentrazione di polimero.

Lo stesso trattamento è stato effettuato sui campioni di polimero derivante dalle fermentazioni preparando soluzioni di concentrazione rientranti nel range 0.625 – 5 mg/l; dopodiché i campioni sono stati analizzati spettrofotometricamente.

Per quanto riguarda l'analisi HPLC [81], in primo luogo è stato individuato l'intervallo di concentrazioni all'interno del quale è rilevabile l'acido crotonico. A tale scopo sono state preparate soluzioni di acido crotonico in acido solforico 0.005 M nel range di concentrazione 0.00875 – 0.14 mg/ml, tenendo conto del volume di iniezione pari a 100 µl. Ciascuna soluzione è stata filtrata con filtro in PTFE 0.45 µm prima dell'iniezione. Sfruttando queste soluzioni è stata anche costruita la retta di taratura dell'acido crotonico.

Lo standard PHB ed i campioni derivanti dalle fermentazioni ottenuti dal trattamento di digestione con acido solforico sono stati opportunamente diluiti e filtrati con filtro in PTFE 0.45 µm prima dell'iniezione.

Lo strumento, la colonna e le condizioni operative utilizzate per queste analisi, sono le medesime già citate precedentemente nel paragrafo 8.8.

Il detector utilizzato per individuare l'acido crotonico è un detector UV Kontron Instruments, alla lunghezza d'onda di 210 e di 235 nm.

8.12.2 Analisi FT-IR

La spettrofotometria FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) [82] è una tecnica di analisi spettroscopica che prevede l'utilizzo di uno strumento dotato dell'interferometro di Michelson, il quale produce un interferogramma della sostanza in esame che viene trasformato da un calcolatore in un tradizionale spettro infrarosso mediante una trasformata di Fourier.

I campioni di PHA scelti per questo tipo di analisi sono quelli ottenuti con il metodo di estrazione dell'1,2-propilen carbonato, dato che presentano una maggiore grado di purezza rispetto a quelli ottenuti con il metodo ipoclorito/cloroformio.

Trattandosi di campioni allo stato solido, sono stati polverizzati e finemente dispersi unitamente al sale KBr impiegando un mortaio; la miscela così ottenuta è stata pressata al fine di ottenere una capsula.

La capsula ottenuta, fissata su di un supporto idoneo, è stata analizzata in modalità di "trasmissione", tramite uno spettrometro Nicolet Bruker Equinox 55, in un intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 400 e 4000 cm⁻¹, con risoluzione pari a 2 cm⁻¹ e 64 scansioni.

9. Risultati e discussione

9.1 Fermentazioni con terreno sintetico

In questa sezione sono presentate le prove preliminari di fermentazione, condotte in reattore, impiegando un terreno sintetico costituito dal siero di latte commerciale Molkolac® (Milei GmbH) addizionato della componente salina del terreno *Khardenavis*.

In primo luogo sono state individuate le concentrazioni iniziali di lattosio (fonte di carbonio) e di fosfato acido di ammonio (fonte di azoto) nel terreno di coltura; a tale scopo si è deciso di adottare lo stesso valore del rapporto C/N iniziale che si ha nel terreno *Khardenavis*, pari a 50, fissando la concentrazione di fosfato di ammonio da utilizzare in queste prove di fermentazione allo stesso valore presente nel terreno *Khardenavis* (0.754 g/l) e calcolando di conseguenza la concentrazione di lattosio (20 g/l). La scelta di utilizzare un C/N iniziale di 50 deriva anche da considerazioni in merito ai risultati ottenuti in un precedente lavoro [75], che mostrano come si ottengano rese in PHA riferite alla biomassa ($Y_{PHA/X}$) più elevate, adottando questo valore di C/N iniziale.

Riguardo al volume di inoculo utilizzato nelle fermentazioni, costituito dalle colture di arricchimento (come descritto nel capitolo Materiali e Metodi), è stato adottato un volume pari al 10 % del volume totale di coltura. Il criterio di questa scelta è dettato in primo luogo dal fatto che risulta essere la concentrazione più utilizzata in campo biotecnologico, ed in secondo luogo, precedenti lavori in beuta, hanno mostrato come all'aumento del volume di inoculo dal 10 % al 30 % del volume totale di coltura, corrisponda, sostanzialmente, la stessa quantità finale di biomassa ottenuta, con effetti trascurabili sulla quantità di polimero accumulato.

L'età delle colture di arricchimento, impiegate per l'inoculo è di 72 ore, tempo al quale la biomassa si trova in fase esponenziale [75].

9.1.1 Fermentazioni senza controllo di temperatura e pH

Lo scopo di questa prima fermentazione, denominata NC, le cui condizioni operative sono riepilogate in tabella 9.1, è quello di valutare la capacità del consorzio microbico di utilizzare una fonte di carbonio differente dall'acido acetico e di comprendere le sue prestazioni riguardo la sintesi di PHA senza controllare la temperatura ed il pH durante la fermentazione.

Tabella 9.1: condizioni operative della fermentazione NC

Fermentazione	NC
Tipo di microrganismo	biomassa mista
Terreno	Sali <i>Khardenavis</i> + Molkolac®
Tipo di inoculo	inoculo da coltura di arricchimento dei fanghi
Modalità di coltura	batch
Volume di lavoro	10 l
Inoculo	10 % v/v
OD inoculo (620 nm)	0.8 < OD 620 < 1
Età inoculo	72 h
Lattosio iniziale	20 g/l
C/N iniziale	50
Controllo di pH	NO
Controllo di T	NO
Temperatura (stimata)	23-26 °C
Agitazione	80 rpm
Aerazione	superficiale

A tal fine sono state monitorate le variabili di processo utili a fornire informazioni circa il suo andamento ed in particolare: la densità ottica a 620 nm, il pH, la concentrazione del substrato (lattosio) e dell'azoto, a seguito della determinazione dell'ammonio (derivante dal fosfato acido di ammonio). Sono stati inoltre determinati il peso secco e la quantità di PHA accumulato dai microrganismi in maniera da poter calcolare la resa in PHA riferita alla biomassa.

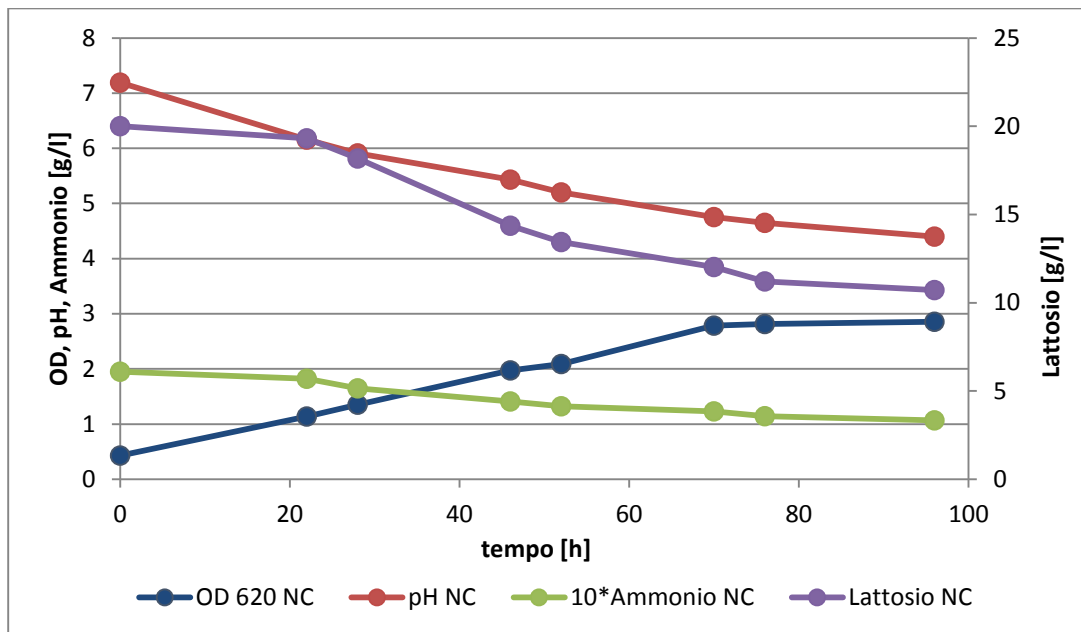


Figura 9.1: andamento di OD (620 nm), pH, lattosio e 10*ammonio della fermentazione NC.

Dall'osservazione dei dati diagrammati nella figura 9.1, è possibile notare che in queste condizioni di coltura la biomassa è in grado di crescere ed utilizzare il lattosio come substrato, la fase di crescita stazionaria viene raggiunta a 70 ore di fermentazione, in corrispondenza di una concentrazione di lattosio di 12 g/l, di ammonio di 0.123 g/l e di un pH pari a 4.75.

Nelle condizioni operative adottate per questa fermentazione, protratta fino a 96 ore, non viene raggiunto né l'esaurimento dell'ammonio (0.107 g/l residui), né l'esaurimento del lattosio (10.72 g/l residui), come invece sarebbe auspicabile per poter ottenere un'efficienza della fermentazione elevata in termini di resa rispetto al substrato.

La massima concentrazione di biomassa ottenuta è di circa 1 g/l, a 96 ore di fermentazione (Tabella 9.2); per quanto riguarda la resa in PHA, si osserva che il valore massimo pari al 38 % è raggiunto già a 28 ore di fermentazione, tale valore corrisponde ad una concentrazione di polimero di 0.258 g/l. Con il proseguimento della fermentazione, la resa e la concentrazione di PHA si mantengono pressoché costanti fino a 46 ore, per poi scendere lievemente a 70 ore. Al termine della fermentazione, a 96 ore, si registra la concentrazione di PHA più elevata (dovuta alla concentrazione di biomassa più elevata), pari a 0.385 g/l, corrispondente ad una resa del 36.93 %.

Considerando i valori del rapporto C/N, è da notare come esso si mantenga all'incirca costante per tutta la durata della fermentazione, questo significa che il rapporto tra le velocità di consumo del substrato e della fonte di azoto restano costanti; tale fatto spiega come mai la resa in PHA si mantenga circa costante e non aumenti, infatti si tratta di un metabolita secondario, la cui sintesi è favorita dalla limitazione di uno dei macronutrienti (azoto) che nel caso di questa fermentazione non si è verificata.

Tabella 9.2: concentrazione di biomassa, PHA, resa e rapporto C/N della fermentazione NC

Tempo [h]	Biomassa [g/l]	PHA [g/l]	$Y_{PHA/X}$ [%]	C/N
28	0.678	0.258	38.01	54
46	0.723	0.257	35.52	50
70	0.907	0.229	25.28	48
96	1.043	0.385	36.93	49

Il comportamento della biomassa nei confronti del consumo dei nutrienti potrebbe essere spiegato da una inibizione dovuta al pH che raggiunge valori acidi (in relazione alla sintesi di acidi organici che caratterizza il metabolismo di tutti gli organismi viventi). Diventa a questo punto importante verificare questa ipotesi conducendo una fermentazione in cui sia la temperatura sia soprattutto il pH siano controllati.

9.1.2 Fermentazioni con controllo di temperatura, pH e concentrazione di lattosio 20 g/l

In questa fermentazione, denominata C 20, i parametri temperatura e pH sono stati controllati rispettivamente a 30 ± 0.2 °C e 7 ± 0.02 ; sono inoltre stati monitorati i parametri: densità ottica a 620 nm, concentrazione di substrato (lattosio) e di azoto, oltre ad aver determinato il peso secco della biomassa e la quantità di PHA accumulato. Le condizioni operative sono riassunte nella seguente tabella 9.3.

Tabella 9.3: condizioni operative della fermentazione C 20

Fermentazione	C 20
Tipo di microrganismo	biomassa mista
Terreno	Sali Khardenavis + Molkolac®
Tipo di inoculo	inoculo da coltura di arricchimento dei fanghi
Modalità di coltura	batch
Volume di lavoro	5 l
Inoculo	10 % v/v
OD inoculo (620 nm)	$0.8 < OD_{620} < 1$
Età inoculo	72 h
Lattosio iniziale	20 g/l
C/N iniziale	50
Controllo di pH	7 ± 0.02
Controllo di T	30 ± 0.2 °C
Agitazione	125 rpm
Aerazione	superficiale

Osservando le grandezze diagrammate in figura 9.2, è possibile notare che in questa fermentazione la fase di crescita stazionaria viene raggiunta a 22 ore di fermentazione, in corrispondenza di un quantitativo di ammonio prossimo all'esaurimento (0.01 g/l) e ad una concentrazione di lattosio di 5.62 g/l, quest'ultimo è stato esaurito a 29 ore di fermentazione.

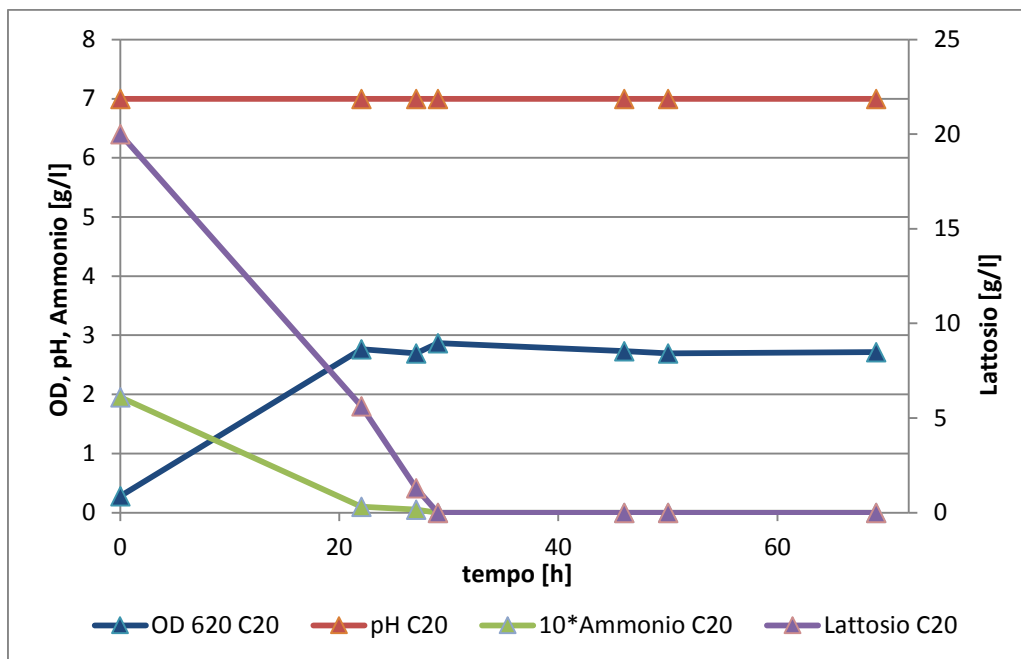


Figura 9.2 andamento di OD (620nm), pH, lattosio e 10*ammonio della fermentazione C 20.

Considerando la resa in PHA (Tabella 9.4), si osserva che dal valore di 22 ore pari al 25.24 %, si registra un aumento al 37.34 % delle 29 ore; questo aumento avviene in concomitanza dell'esaurimento dell'ammonio a 22 ore, confermando la natura di metabolita secondario dei PHA. La resa aumenta ancora a 46 ore quando viene registrato un valore del 40.53 %, dopodiché si registra un andamento oscillante tra il 39.65 % alle 50 ore ed 41.20 % alle 69 ore, corrispondente al valore massimo raggiunto in fermentazione; la massima concentrazione di PHA che si ottiene a 50 ore e risulta pari a 0.694 g/l.

Tabella 9.4: concentrazione di biomassa, PHA, e resa della fermentazione C 20.

<i>Tempo</i> [h]	<i>Biomassa</i> [g/l]	<i>PHA</i> [g/l]	<i>Y_{PHA/X}</i> [%]
22	1.671	0.422	25.24
29	1.754	0.655	37.34
46	1.668	0.676	40.53
50	1.751	0.694	39.65
69	1.663	0.685	41.20

Considerando i risultati ottenuti è possibile affermare che il controllo di temperatura e soprattutto quello di pH hanno consentito di migliorare le prestazioni della fermentazione sotto tutti i punti di vista, sia da quello del completo utilizzo dei nutrienti, sia dell'ottenimento dei prodotti, così come discusso in modo dettagliato nel paragrafo successivo.

9.1.3 Confronto tra le fermentazioni NC e C 20

Osservando gli andamenti delle grandezze rappresentate in figura 9.3 relative alla fermentazione C 20 e confrontandoli con i risultati ottenuti nel corso della fermentazione NC, è possibile osservare la notevole influenza esercitata dal pH: anche se il valore massimo di assorbanza risulta confrontabile,

la fase stazionaria nella fermentazione *C 20* viene raggiunta in circa 22 ore, contro le circa 70 della fermentazione *NC*. Inoltre durante la fermentazione *C 20*, subito dopo il raggiungimento della fase stazionaria, alla 29esima ora, il lattosio e l'ammonio risultano già praticamente esauriti mentre nel corso della fermentazione *NC* il consumo completo del substrato e della fonte di azoto non sono raggiunti. La notevole velocità di consumo del substrato e della fonte di azoto nella fermentazione *C 20* durante la fase esponenziale, viene evidenziata anche dal consumo di NaOH utilizzato per la correzione del pH; occorrono, infatti, per mantenere il pH prossimo alla neutralità, circa 1.4 moli di NaOH, in 30 ore, corrispondenti ad una velocità di consumo dell'idrossido di sodio pari a circa 0.05 moli h^{-1} . Nella successiva fase stazionaria, il consumo di idrossido di sodio rallenta decisamente in quanto dalla 25sima alla 45sima ora vengono consumate solo 0.25 moli di NaOH, corrispondenti ad una velocità di consumo di $0.0125 \text{ moli h}^{-1}$.

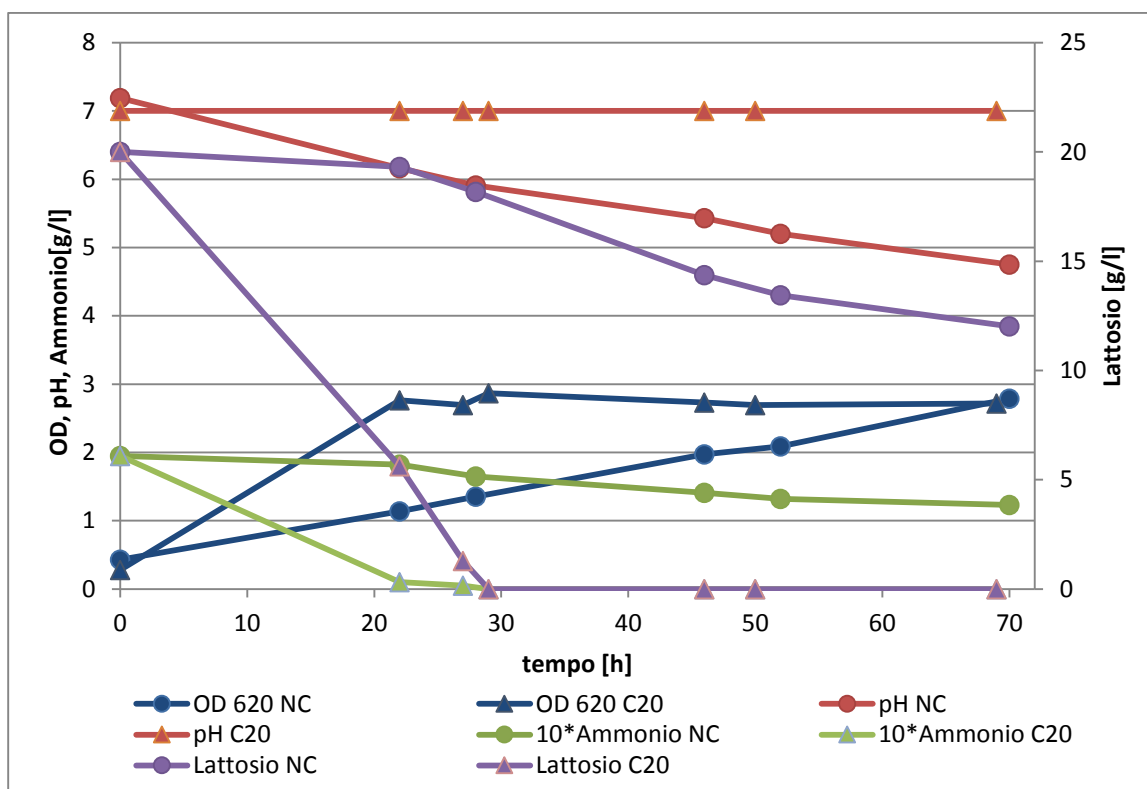


Figura 9.3 confronto delle fermentazioni NC e C: andamento di OD (620nm), pH, lattosio e ammonio.

In definitiva, la fermentazione batch in condizioni controllate ha mostrato un notevole aumento della cinetica di consumo dei macronutrienti.

Continuando il confronto con la fermentazione *NC*, si può notare come la massima concentrazione di biomassa (Tabella 9.5), circa 1 g/l, risulti decisamente inferiore rispetto alla fermentazione *C 20*, durante la quale si raggiungono circa 1.75 g/l.

La massima concentrazione di polimero si ha subito dopo il raggiungimento della fase stazionaria con valori nell'ordine di 0.7 g/l, circa il doppio (0.3 g/l) rispetto alla fermentazione *NC*.

Nella fermentazione *C 20*, si registra un valore circa costante della resa di polimero nel tempo; tale constatazione è importante in quanto è conseguenza del fatto che non si sono avuti macroscopici effetti di depolimerizzazione, nonostante la fermentazione sia stata condotta per oltre 40 ore dopo il completo esaurimento dei macronutrienti (dalla 30sima alla 70sima ora): ciò induce a pensare o che

la biomassa non sia in grado di sintetizzare gli enzimi necessari all'idrolisi del poliestere, come nel caso dell'*rE. coli* [57], o che la cinetica di depolimerizzazione sia talmente lenta, in queste condizioni operative, da risultare trascurabile.

Considerando infine le produttività orarie in PHA, è possibile constatare che la condizione migliore è stata registrata, nella fermentazione *NC*, a 48 ore con un valore pari a $0.0056 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$, mentre nel caso della fermentazione *C 20*, a 28 ore con un valore di $0.0226 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$, quattro volte superiore alla fermentazione *NC*. Quest'ultimo risultato raggiunto consentirebbe di condurre, nell'economia del processo, fermentazioni più brevi, consentendo, di conseguenza, un contenimento dei costi di processo.

Tabella 9.5: concentrazione di biomassa, PHA, resa e produttività delle fermentazione *NC* e *C 20*.

Fermentazione	Tempo [h]	Biomassa [g/l]	PHA [g/l]	$Y_{\text{PHA/X}}$ [%]	Produttività PHA [$\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]
Fermentazione <i>NC</i>	28	0.678	0.258	38.01	0.0092
	48	0.723	0.257	35.52	0.0056
	70	0.907	0.229	25.28	0.0033
Fermentazione <i>C</i>	28	1.754	0.655	37.34	0.0226
	48	1.668	0.676	40.53	0.0147
	70	1.663	0.685	41.20	0.0099

9.1.4 Fermentazioni con controllo di temperatura, pH e concentrazione di lattosio 40 g/l

Lo scopo di questa prova, denominata *C 40*, è di valutare l'effetto della concentrazione del substrato sul consorzio microbico e sulla produzione di PHA, incrementando la concentrazione iniziale di lattosio da 20 g/l a 40 g/l e mantenendo il rapporto C/N iniziale a 50; queste informazioni risultano indispensabili in quanto il siero di latte e la scotta contengono per loro natura una concentrazione di lattosio prossima a 40 g/l e nell'ottica di uno scale up su scala industriale, risulterebbe controproducente, dal punto di vista dell'economia di processo, dover utilizzare queste matrici in forma diluita.

Le condizioni operative sono riassunte nella seguente tabella 9.6: come nella precedente fermentazione *C 20*, i parametri temperatura e pH sono stati controllati rispettivamente a $30 \pm 0.2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e 7 ± 0.02 . Sono inoltre stati monitorati i seguenti parametri: densità ottica a 620 nm, concentrazione di substrato (lattosio) e di azoto, e sono stati determinati il peso secco della biomassa e la quantità di PHA accumulato.

Tabella 9.6: condizioni operative della fermentazione C 40.

Fermentazione	C 40
Tipo di microrganismo	biomassa mista
Terreno	Sali Khardenavis + Molkolac®
Tipo di inoculo	inoculo da coltura di arricchimento dei fanghi
Modalità di coltura	batch
Volume di lavoro	5 l
Inoculo	10 % v/v
OD inoculo (620 nm)	0.8 < OD 620 < 1
Età inoculo	72 h
Lattosio iniziale	40 g/l
C/N iniziale	50
Controllo di pH	7 ± 0.02
Controllo di T	30 ± 0.2 °C
Agitazione	125 rpm
Aerazione	superficiale

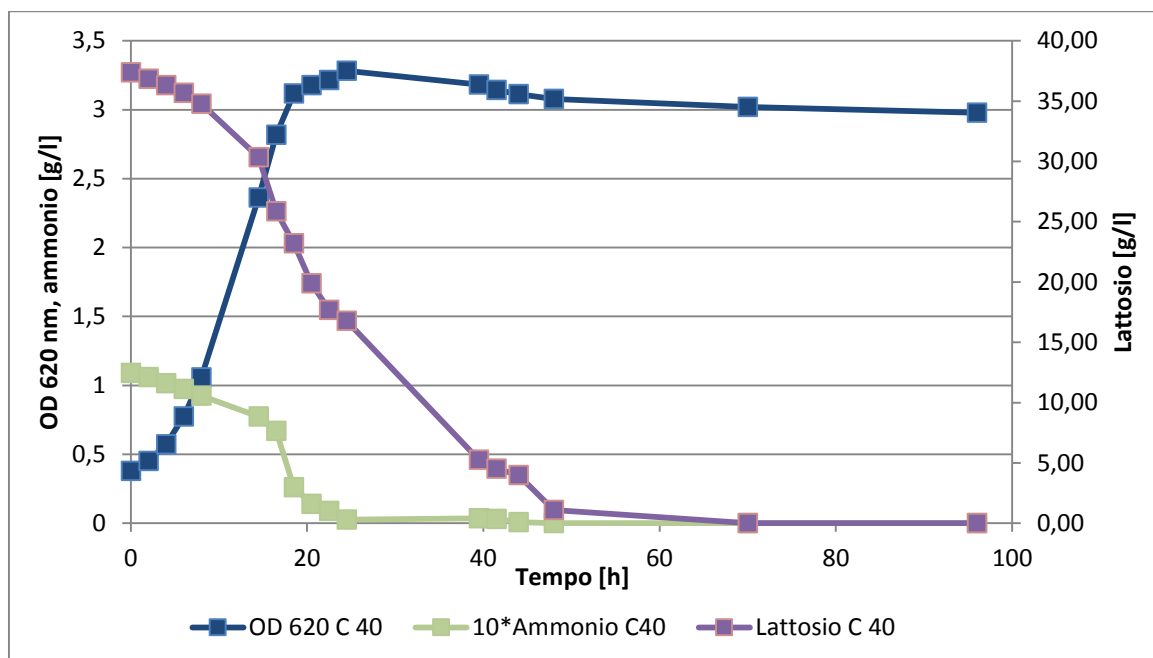


Figura 9.4: andamento di OD (620 nm), lattosio e 10*ammonio della fermentazione C 40.

Osservando gli andamenti rappresentati in figura 9.4, è possibile notare che durante la fermentazione C 40 la fase di crescita stazionaria è stata raggiunta a 24 ore di coltura, in corrispondenza di un quantitativo di ammonio residuo prossimo all'esaurimento (0.003 g/l) e ad una concentrazione di lattosio di 16.78 g/l, quest'ultimo verrà esaurito a 48 ore di fermentazione.

Tabella 9.7: concentrazione di biomassa, PHA, e resa della fermentazione C 40

Tempo [h]	Biomassa [g/l]	PHA [g/l]	$Y_{PHA/X}$ [%]
28	1.715	0.887	51.70
48	1.673	0.786	47.04
70	1.602	0.698	43.65

Per quanto riguarda la quantità di biomassa prodotta (tabella 9.7) durante la fermentazione, il valore massimo di 1.715 g/l è stato registrato a 28 ore in corrispondenza di una concentrazione di lattosio residua pari a 14 g/l ed un ammonio prossimo all'esaurimento.

Considerando la resa in PHA, è possibile osservare che a 22 ore si registra un valore massimo pari al 51.7 %, che corrisponde anche alla massima concentrazione di PHA (0.887 g/l). La resa tende a decrescere nel corso della fermentazione raggiungendo il 47.04 % (0.786 g/l di PHA) a 48 ore ed il 43.65 % (0.698 g/l di PHA) a 70 ore.

Considerando questi risultati è possibile affermare che il consorzio microbico è in grado di crescere anche con una concentrazione di substrato doppia rispetto ai primi due test, senza che questo possa risultare inibente, inoltre le rese ottenute sono state superiori rispetto alla fermentazione C; a questo punto occorre un confronto dettagliato tra le fermentazioni C 20 e C 40 che verrà effettuato nel prossimo paragrafo.

9.1.5 Confronto tra le fermentazioni C 20 e C 40

Osservando gli andamenti delle grandezze rappresentate in figura 9.5 relative alla fermentazione C 20 e C 40, è possibile osservare che la fase di crescita stazionaria è stata raggiunta a 22 ore nella caso della fermentazione C 20 ed a 24 ore nel caso della fermentazione C 40, quindi in tempi piuttosto vicini e soprattutto quando in entrambi i casi la fonte di azoto si era pressoché esaurita: 0.01 g/l a 22 ore durante la fermentazione C 20 e 0.009 g/l a 24 ore per quella C 40.

L'esaurimento del lattosio è stato registrato a 29 ore nel caso della fermentazione C 20 e poco dopo le 48 ore nel caso della fermentazione C 40, considerando che il quantitativo di lattosio iniziale nella fermentazione C 40 è doppio rispetto alla fermentazione C 20.

Dal punto di vista della biomassa prodotta (Tabella 9.8) le due fermentazioni non si discostano molto, la fermentazione C 20 registra un valore seppur di poco superiore a 28 ore (1.754 g/l) rispetto alla fermentazione C 40 (1.715 g/l), mentre presentano valori confrontabili a 48 ore. In entrambi i casi la concentrazione di biomassa tende a scendere nel corso della fermentazione a seguito del progressivo esaurimento del substrato.

Riguardo la produzione di PHA, nel caso della fermentazione C 40, si registrano rese costantemente superiori ed anticipate temporalmente rispetto alla fermentazione C 20: a 28 ore della fermentazione C 40 è stato raggiunto il valore massimo del 51.70 % contro il 41.20 % della fermentazione C 20 a 70 ore. Un discorso analogo vale per la concentrazione di PHA: nel caso della fermentazione C 40 la concentrazione massima di 0.887 g/l si raggiunge a 28 ore mentre si registra un valore di 0.685 g/l a 70 ore nella fermentazione C 20.

Per quanto riguarda le produttività ottenute, in questo caso si registra una prestazione migliore della fermentazione C 20, infatti il valore più elevato raggiunto è di $0.0226 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a 28 ore di coltura, contro lo $0.0164 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a 48 ore della fermentazione C 40.

In ultima analisi le condizioni più favorevoli risultano essere quelle della fermentazione C 40, infatti, nell'ottica dell'economia di un processo industriale, consentirebbero di poter interrompere la fermentazione già a 28 ore (rispetto alle 70 ore della fermentazione C 20) consentendo di ottenere i valori massimi di resa e concentrazione di polimero.

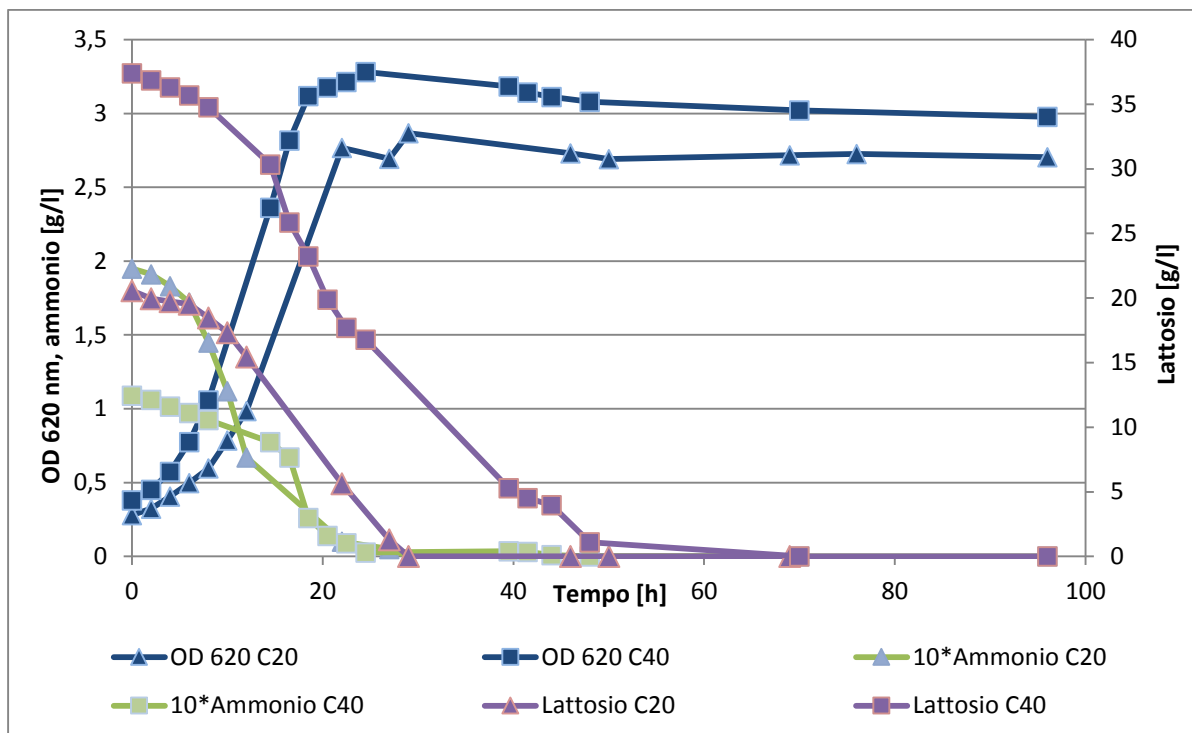


Figura 9.5 confronto delle fermentazioni C 20 e C 40: OD (620 nm), lattosio e 10*ammonio.

Tabella 9.8: concentrazione di biomassa, PHA, resa e produttività delle fermentazione C 20 e C 40.

Fermentazione	Tempo [h]	Biomassa [g/l]	PHA [g/l]	$Y_{PHA/X}$ [%]	Produttività PHA [$g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$]
Fermentazione C 20	28	1.754	0.655	37.34	0.0226
	48	1.668	0.676	40.53	0.0147
	70	1.663	0.685	41.20	0.0099
Fermentazione C 40	28	1.715	0.887	51.70	0.0032
	48	1.673	0.786	47.04	0.0164
	70	1.602	0.698	43.65	0.0099

A questo punto è possibile affermare che l'incremento della concentrazione iniziale del substrato porta a rese, concentrazioni e produttività di PHA superiori, tuttavia tali valori sono inferiori ai valori attesi probabilmente perché parte del metabolismo microbico viene indirizzato verso la produzione di acidi, fatto testimoniato da un incremento del consumo di NaOH di 0.4 moli nelle prime 48 ore di fermentazione rispetto alla fermentazione C 20. Questa ipotesi verrà valutata nelle successive fermentazioni con siero reale.

9.2 Fermentazioni con scotta e siero di latte

In questo paragrafo verranno presentate le prove di fermentazione in reattore, su scala di laboratorio, condotte impiegando come terreno di coltura scotta e siero di latte (in particolare il siero derivante dalla produzione della toma).

Queste due matrici sono state inizialmente utilizzate dopo essere state pretrattate secondo i processi descritti nel capitolo Materiali e Metodi (precipitazione termocalcica, microfiltrazione ed ultrafiltrazione), sotto forma di permeato ottenuto dal processo di ultrafiltrazione (condotta con una membrana da 30 kDa), quindi delipidizzati e deproteinati. Oltre al pretrattamento è stato scelto di correggere il C/N iniziale a 50, come nelle colture condotte con terreno sintetico addizionato di siero di latte commerciale Molkolac®, mediante addizione di cloruro di ammonio (NH_4Cl). Quest'ultimo reagente ha sostituito il fosfato acido d'ammonio ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) utilizzato in precedenza, in maniera da non fornire alla coltura anche una fonte di fosforo e quindi poter valutare il solo contributo dato dall'addizione dell'ammonio. La quantità di reagente da addizionare è stata calcolata valutando preliminarmente il contenuto di lattosio della scotta o del siero impiegati.

Sono stati condotti anche altri due tipi di fermentazione che differiscono per il terreno utilizzato: la prima che ha visto impiegato il permeato da ultrafiltrazione di scotta, senza correzione del C/N iniziale, e la seconda senza pretrattamento della scotta e quindi in presenza dei lipidi e delle proteine originari. Queste scelte sono state effettuate nell'ottica di valutare la capacità di crescita e la produzione di PHA del consorzio microbico in presenza di un terreno meno costoso (grazie all'assenza dei pretrattamenti), in maniera da consentire una maggiore economia del processo su scala superiore.

Anche in queste fermentazioni, l'inoculo utilizzato è costituito dalle colture di arricchimento; il volume impiegato è stato mantenuto pari al 10 % del volume totale di coltura e la sua concentrazione è stata standardizzata effettuando diluizioni in maniera che i valori di densità ottica a 620 nm rientrassero nel range 0.8-1. L'età delle colture di arricchimento impiegate è stata di 72 ore.

9.2.1 Fermentazione con permeato di scotta e correzione del rapporto C/N

Lo scopo di questa fermentazione, le cui condizioni operative sono riassunte in Tabella 9.9, è stato quello di valutare se il consorzio microbico fosse in grado di utilizzare il permeato di scotta per la crescita e la sintesi dei PHA; è stato scelto, in questa prima prova, di correggere il C/N iniziale a 50 per porsi in condizioni analoghe alle fermentazioni presentate in precedenza con terreno sintetico.

La temperatura ed il pH sono stati controllati rispettivamente a 30 ± 0.2 °C e 7 ± 0.02 , quest'ultimo è stato corretto mediante l'addizione di NaOH 5 M.

Durante la fermentazione sono stati monitorati i parametri: densità ottica a 620 nm, concentrazione di lattosio e di ammonio, il peso secco della biomassa e la quantità di PHA accumulato, oltre ad aver valutato la produzione di acidi organici ed in particolare l'acido lattico.

Osservando gli andamenti riportati in Figura 9.6, ed in particolare l'OD 620 nm, si riscontra che il consorzio microbico è stato in grado di crescere utilizzando questo terreno addizionato di cloruro d'ammonio, la fase di crescita stazionaria è stata raggiunta in 24 ore di coltura, a questo tempo di fermentazione, la concentrazione di lattosio residuo misurata è stata di 3 g/l, mentre quella di ammonio, prossimo all'esaurimento, di 0.06 g/l.

Per quanto riguarda la quantità di biomassa prodotta durante la fermentazione, riportata in Tabella 9.10, il valore massimo è stato registrato a 29 ore di coltura, pari a 2.687 g/l in corrispondenza di una concentrazione di lattosio residua pari a 1 g/l e di ammonio pressoché esaurito.

Tabella 9.9: condizioni operative della fermentazione Scotta CN 50

Fermentazione	Scotta CN 50
Tipo di microrganismo	biomassa mista
Terreno	Permeato da scotta UF 30 kDa
Tipo di inoculo	inoculo da coltura di arricchimento dei fanghi
Modalità di coltura	batch
Volume di lavoro	4 l
Inoculo	10 % v/v
OD inoculo (620 nm)	0.8 < OD 620 < 1
Età inoculo	72 h
Lattosio iniziale	38 g/l
C/N iniziale	50
Controllo di pH	7 ± 0.02
Controllo di T	30 ± 0.2 °C
Agitazione	125 rpm
Aerazione	superficiale

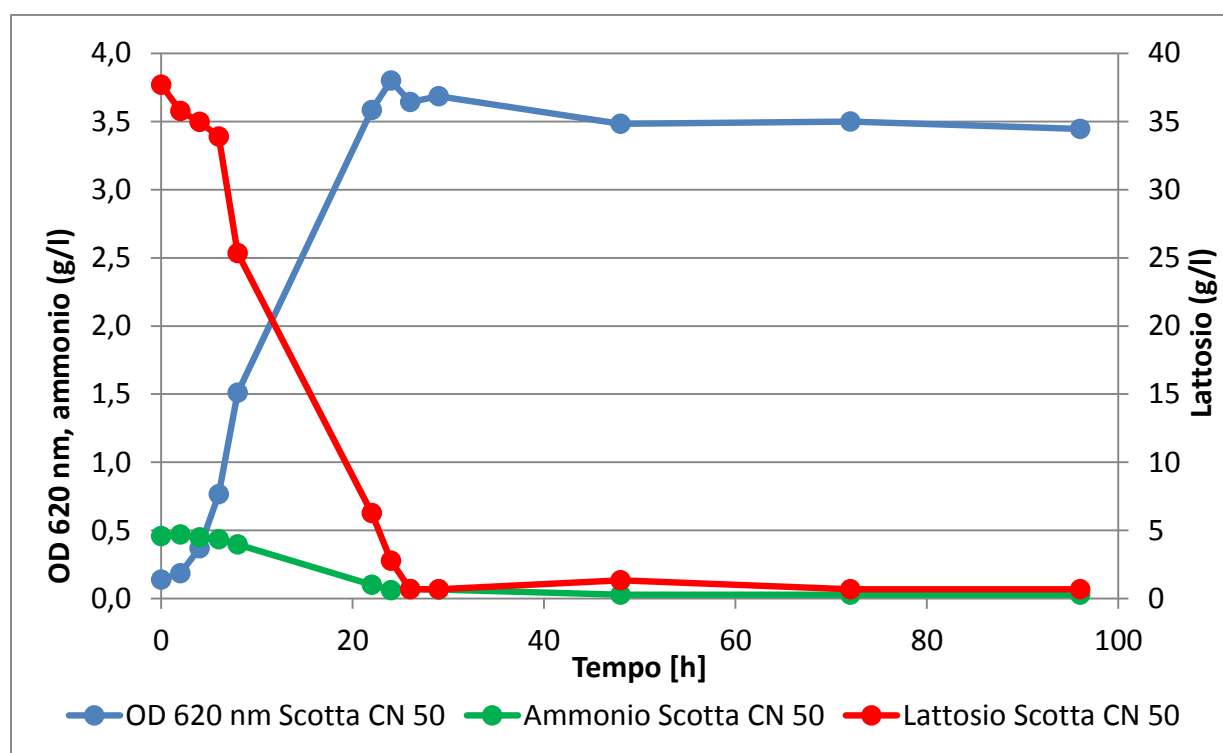


Figura 9.6: andamento di OD (620 nm), lattosio e ammonio della fermentazione Scotta CN 50.

Considerando la resa in PHA, è possibile osservare che a 29 ore si registra già un valore molto prossimo a quello massimo, pari al 45.77 %, che corrisponde alla massima concentrazione di PHA (1.230 g/l). La resa tende a decrescere nel corso della fermentazione raggiungendo il 39.11 % (0.832 g/l di PHA) a 48 ore per tornare ad aumentare alle 72 ore raggiungendo il valore del 45.83 %, però corrispondente ad una concentrazione di polimero inferiore (0.967 contro 1.230 g/l delle 29 ore) a causa della minore concentrazione di biomassa presente.

Durante questa fermentazione è stata determinata la produzione di acido lattico (Tabella 9.10), la sua concentrazione aumenta durante la fermentazione fino a raggiungere la concentrazione più elevata di 3.46 g/l a 48 ore di coltura, per tornare a scendere fino a 2.74 g/l a 72 ore.

Tabella 9.10: concentrazione di biomassa, PHA, e resa della fermentazione Scotta CN 50.

Tempo [h]	Biomassa [g/l]	PHA [g/l]	$Y_{PHA/X}$ [%]	Acido lattico [g/l]
29	2.687	1.230	45.77	0.7
48	2.127	0.832	39.11	3.46
72	2.110	0.967	45.83	2.74

I risultati ottenuti nella fermentazione *Scotta CN 50* si sono rivelati migliori di quanto ottenuto nella precedente fermentazione *C 40*, nel prossimo paragrafo verrà effettuato un confronto diretto tra queste due fermentazioni.

9.2.2 Confronto tra le fermentazioni *C 40* e *Scotta CN 50*

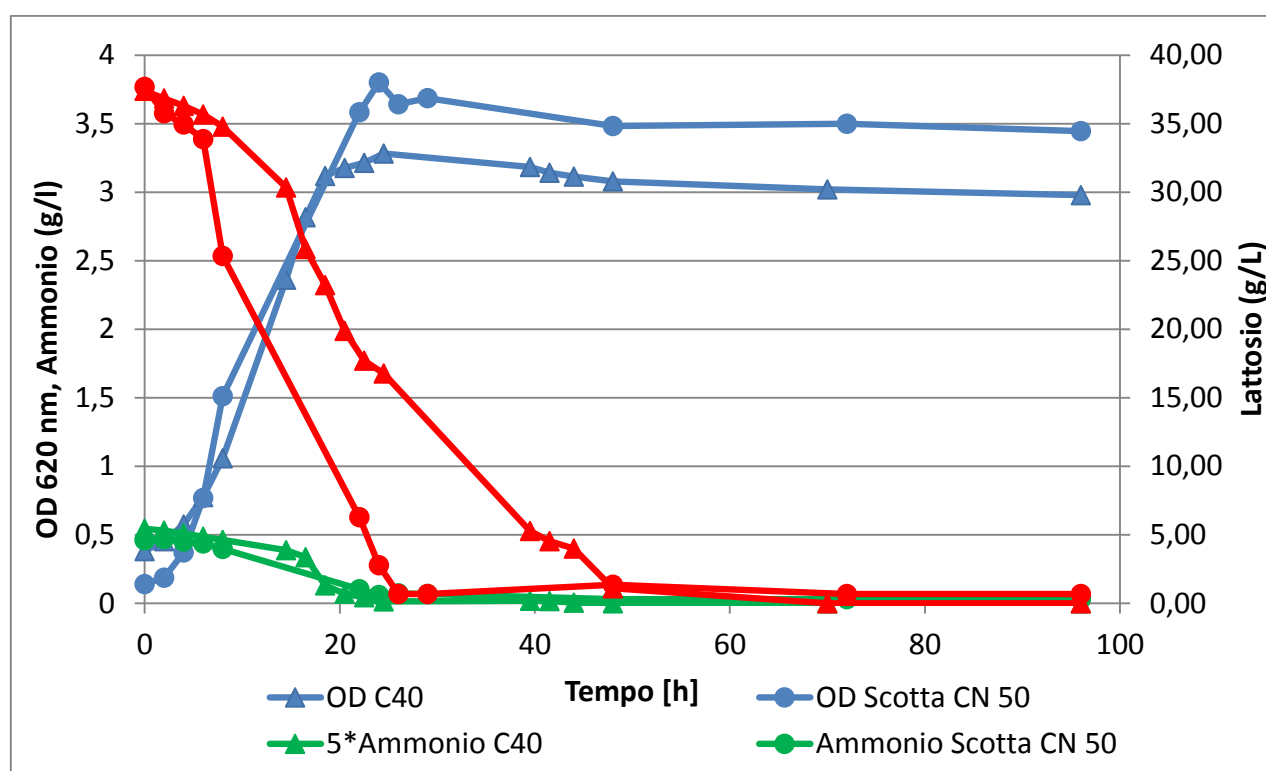


Figura 9.7 confronto delle fermentazioni *C 40* e *Scotta CN 50*: andamento di OD (620 nm), lattosio e ammonio.

In figura 9.7 è rappresentato il confronto delle fermentazioni *C 40* e *Scotta CN 50* dal punto di vista della crescita della biomassa e del consumo dei nutrienti. Osservando gli andamenti è possibile osservare che la fase di crescita stazionaria viene raggiunta a circa 24 ore in entrambe le fermentazioni, quando la fonte di azoto è prossima all'esaurimento.

La concentrazione iniziale di substrato è di circa 38 g/l in entrambe le fermentazioni, ma la cinetica di consumo risulta più lenta nella fermentazione *C 40*, infatti a 24 ore la concentrazione residua è pari a 16.78 g/l e verrà esaurito a 48 ore mentre nella fermentazione *Scotta CN 50* a 24 ore sono presenti solamente 3 g/l di lattosio che saranno pressoché esauriti a 26 ore.

Nella fermentazione *Scotta CN 50* la biomassa ha trovato condizioni più favorevoli di crescita, il valore del rapporto C/N, a 24 ore, risulta inferiore (pari a 27) rispetto alla fermentazione *C 40* (pari a 3074), così da favorire la crescita dei microrganismi rispetto all'accumulo dei PHA.

Durante tutta la fermentazione *Scotta CN 50* la concentrazione di biomassa è risultata più elevata rispetto alla fermentazione *C 40*, a 29 ore è stato registrato il valore più elevato di 2.687 g/l, contro gli 1.715 g/l della fermentazione *C 40* (Tabella 9.11).

Il rapporto C/N influenza anche le rese in PHA registrate, che risultano inferiori nella fermentazione *Scotta CN 50* rispetto alla *C 40*: a 29 ore della prima è stato raggiunto il 45.77 % contro il 51.70 % della seconda; tuttavia a fronte di una maggiore concentrazione di biomassa raggiunta, deriva che la concentrazione di PHA è più elevata nel caso della fermentazione *Scotta CN 50*, infatti a 29 ore sono stati ottenuti 1.230 g/l contro 0.887 g/l a 28 ore della fermentazione *C 40*, tali concentrazioni corrispondono anche ai massimi valori raggiunti nell'arco di entrambe le fermentazioni; in ogni caso la concentrazione di PHA durante la fermentazione con permeato di scotta e correzione del C/N a 50 si mantiene costantemente più elevata rispetto alla fermentazione con terreno sintetico addizionato di Molkolac®.

Tabella 9.11: concentrazione di biomassa, PHA, resa e produttività delle fermentazione *C 40* e *Scotta CN 50*

Fermentazione	Tempo [h]	Biomassa [g/l]	PHA [g/l]	$Y_{PHA/X}$ [%]	Produttività PHA [g·l⁻¹·h⁻¹]
Fermentazione <i>C 40</i>	28	1.715	0.887	51.70	0.0032
	48	1.673	0.786	47.04	0.0164
	70	1.602	0.698	43.65	0.0099
Fermentazione <i>Scotta CN 50</i>	29	2.687	1.230	45.77	0.0424
	48	2.127	0.832	39.11	0.0173
	72	2.110	0.967	45.83	0.0134

Per quanto riguarda le produttività ottenute, si registrano nuovamente valori più elevati durante la fermentazione *Scotta CN 50*, il valore più elevato raggiunto è di 0.0424 g l⁻¹ h⁻¹ a 29 ore di coltura, contro lo 0.0164 g l⁻¹ h⁻¹ a 48 ore della fermentazione *C 40*.

A seguito dell'ottenimento di risultati positivi con l'utilizzo di permeato da ultrafiltrazione di scotta come terreno di coltura, si è deciso di valutare se prestazioni di fermentazione analoghe potessero essere ottenute anche con un terreno diverso, costituito da permeato derivante dall'ultrafiltrazione del siero di latte.

9.2.3 Fermentazione con permeato di siero di toma e correzione del rapporto C/N

Lo scopo di questa fermentazione, le cui condizioni operative sono riassunte in Tabella 9.12, è stato di valutare se l'utilizzo del permeato da ultrafiltrazione del siero di toma fosse idoneo alla crescita del consorzio microbico e quale effetto avesse sulla produzione di PHA; anche in questa

fermentazione si è deciso di correggere il C/N iniziale a 50 mediante l'aggiunta di cloruro d'ammonio, per porsi in condizioni ottimali, come osservato durante le precedenti fermentazioni.

La temperatura ed il pH sono stati controllati rispettivamente a 30 ± 0.2 °C e 7 ± 0.02 , quest'ultimo è stato corretto mediante l'aggiunta di NaOH 5 M.

I parametri di fermentazione monitorati sono stati: densità ottica a 620 nm, concentrazione di lattosio e di ammonio, il peso secco della biomassa e la quantità di PHA accumulato, la sintesi di acido lattico.

Osservando l'andamento dell'OD 620 nm, riportato in Figura 9.8, si riscontra che il consorzio microbico è stato in grado di crescere anche con questo tipo terreno, la fase di crescita stazionaria è stata raggiunta verosimilmente intorno alle 22 ore di coltura, tuttavia potrebbe essere stata raggiunta anche con un certo anticipo rispetto a questo tempo, ma la pianificazione dei campionamenti non ha consentito di effettuare prelievi intorno a 18- 20 ore di coltura. Il fatto che la fase stazionaria sia stata raggiunta a 22 ore, è anche avvalorato dalla concentrazione di lattosio e di ammonio residui misurati a questo tempo di coltura, di 4 g/l e di 0.01 g/l, rispettivamente.

Tabella 9.12: condizioni operative della fermentazione Toma CN 50

<i>Fermentazione</i>	<i>Toma CN 50</i>
<i>Terreno</i>	Permeato da siero di toma UF 30 kDa
<i>Tipo di inoculo</i>	inoculo da coltura di arricchimento dei fanghi
<i>Modalità di coltura</i>	batch
<i>Volume di lavoro</i>	4 l
<i>Inoculo</i>	10 % v/v
<i>OD inoculo (620 nm)</i>	$0.8 < OD_{620} < 1$
<i>Età inoculo</i>	72 h
<i>Lattosio iniziale</i>	42 g/l
<i>C/N iniziale</i>	50
<i>Controllo di pH</i>	7 ± 0.02
<i>Controllo di T</i>	30 ± 0.2 °C
<i>Agitazione</i>	125 rpm
<i>Aerazione</i>	superficiale

Per quanto riguarda la quantità di biomassa prodotta durante la fermentazione, i valori più significativi sono riportati in Tabella 9.13; il valore massimo è stato registrato a 24 ore di coltura, pari a 1.171 g/l in corrispondenza di una concentrazione di lattosio residua pari a 2 g/l ed ammonio esaurito.

Considerando la produzione di PHA (Tabella 9.13), è possibile osservare che a 29 ore si registra la resa massima, pari al 37.48 %, che corrisponde alla massima concentrazione di PHA (0.439 g/l). La resa decresce nel corso della fermentazione raggiungendo il 32.58 % (0.361 g/l di PHA) a 48 ore.

Anche in questa fermentazione si è avuta la produzione di acido lattico (Tabella 9.13), la sua concentrazione è aumentata fino a raggiungere il valore più elevato di 4.81 g/l a 24 ore di coltura.

Nel prossimo paragrafo si procederà con un confronto diretto con la precedente fermentazione con permeato da ultrafiltrazione di scotta.

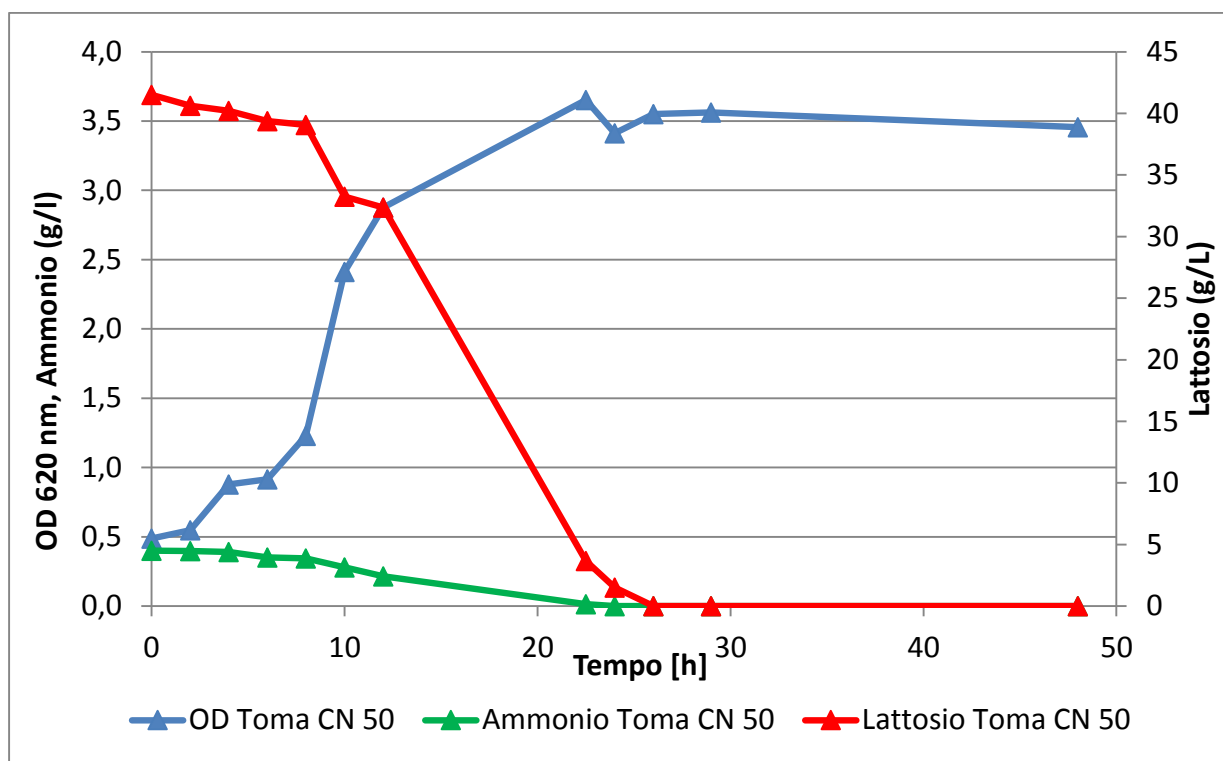


Figura 9.8: andamento di OD (620 nm), lattosio e ammonio della fermentazione Toma CN 50.

Tabella 9.13: concentrazione di biomassa, PHA, resa e PHA produttori della fermentazione Toma CN 50.

Tempo [h]	Biomassa [g/l]	PHA [g/l]	$Y_{PHA/X}$ [%]	Acido lattico [g/l]
24	1.171	0.439	37.48	4.81
48	1.108	0.361	32.58	3.83

9.2.4 Confronto tra le fermentazioni Scotta CN 50 e Toma CN 50

In figura 9.9 è riportato il confronto tra le fermentazioni Scotta CN 50 e Toma CN 50 dal punto di vista della crescita e del consumo dei nutrienti.

La fase stazionaria di crescita viene raggiunta prima, a 22 ore, durante la fermentazione Toma CN 50, rispetto alle 24 ore della fermentazione Scotta CN 50, in concomitanza di concentrazioni di lattosio residue di 3 e 2 g/l rispettivamente. Anche l'esaurimento della fonte di azoto avviene prima, a 24 ore contro le 26 ore della fermentazione Scotta CN 50.

Nonostante sia stato ottenuto l'esaurimento dei nutrienti in entrambe le fermentazioni, la fermentazione Toma CN 50 ha prodotto risultati inferiori sia in termini di biomassa che di PHA prodotti.

Osservando i dati riportati in tabella 9.14, è possibile osservare che la concentrazione di biomassa raggiunta sia a 24 (1.171 g/l) che a 48 ore (1.108 g/l) della fermentazione Toma CN 50 sia inferiore al 50 % di quella prodotta durante la fermentazione Scotta CN 50.

Le rese in PHA risultano confrontabili nelle due fermentazioni, tuttavia, a fronte di una concentrazione di biomassa inferiore nella fermentazione Toma CN 50 (50 %), la concentrazione di PHA che ne deriva risulta piuttosto ridotta. Anche la produttività di PHA risente di questa situazione:

il massimo valore raggiunto dalla fermentazione *Toma CN 50* è di $0.018 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a 24 ore, contro lo $0.042 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ allo stesso tempo della fermentazione *Scotta CN 50*.

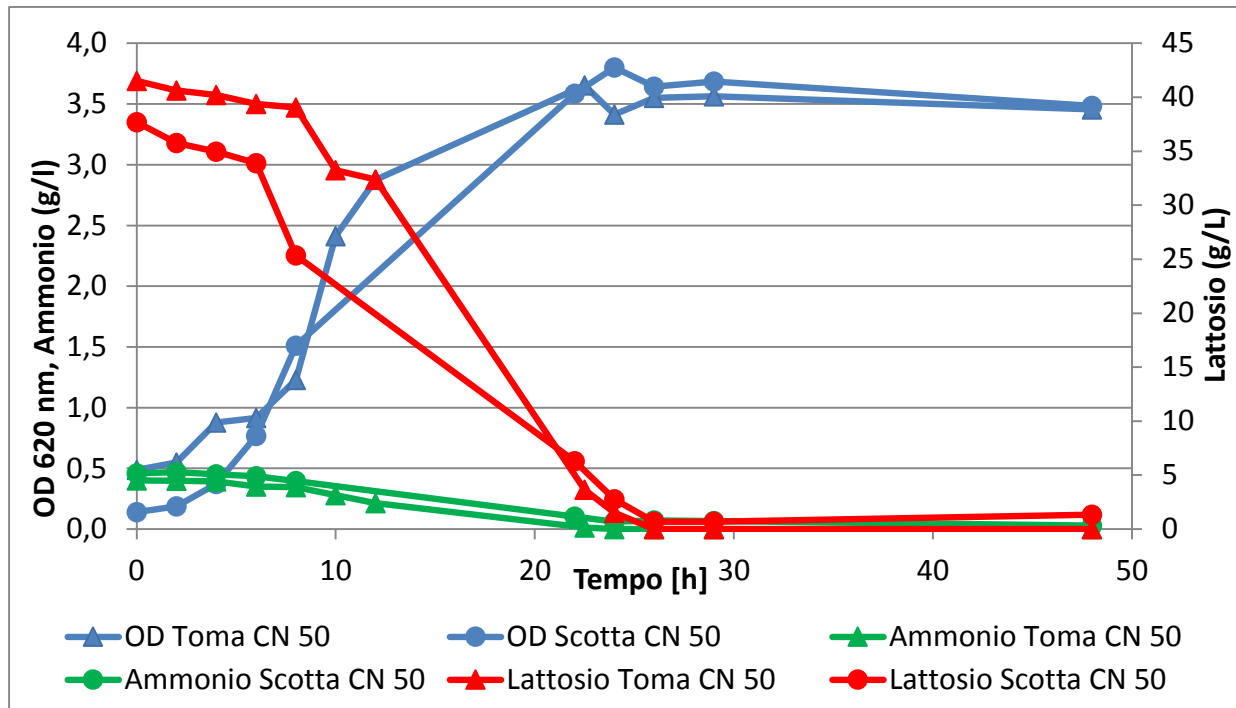


Figura 9.9 confronto delle fermentazioni *Scotta CN 50* e *Toma CN 50*: andamento di OD (620 nm), lattosio e ammonio.

Considerando le due fermentazioni dal punto di vista della conta dei microrganismi PHA produttori, mediante la colorazione con Sudan Black B descritta in Materiali e Metodi, si evidenzia come la percentuale sia più elevata nel caso della fermentazione *Toma CN 50*, sia a 24 che a 48 ore, questo sta a significare che queste condizioni di fermentazione, ed in particolare il terreno, costituito da permeato ottenuto da siero di Toma, non sembrano favorire l'accumulo di PHA, che risulta decisamente più elevato nella fermentazione *Scotta CN 50* dove la percentuale di PHA produttori è inferiore.

Tabella 9.14: concentrazione di biomassa, PHA, resa e produttività delle fermentazione *Scotta CN 50* e *Toma CN 50*

Fermentazione	Tempo [h]	Biomassa [g/l]	PHA [g/l]	$Y_{\text{PHA/X}}$ [%]	Produttività PHA [$\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]	PHA Produttori [%]
Fermentazione <i>Scotta CN 50</i>	24	2.450	0.917	37.4	0.042	37.5
	48	2.127	0.832	39.1	0.017	13.9
Fermentazione <i>Toma CN 50</i>	24	1.171	0.439	37.5	0,018	51.5
	48	1.108	0.361	32.6	0.008	59.9

A tale scopo, i successivi test di fermentazione sono stati condotti impiegando permeato di scotta, questa volta senza correzione del rapporto C/N, in maniera da indagare la crescita del consorzio microbico e la produzione di PHA con un terreno più economico, grazie al risparmio derivante dalla mancata addizione del cloruro d'ammonio.

9.2.5 Fermentazione con permeato di scotta senza correzione del rapporto C/N

Le condizioni operative di questa fermentazione, denominata *Scotta CN TQ*, sono riassunte in Tabella 9.15; al permeato di scotta, in questo caso, non è stato addizionato il sale cloruro d'ammonio.

La temperatura ed il pH sono stati controllati a 30 ± 0.2 °C e 7 ± 0.02 rispettivamente, quest'ultimo è stato corretto mediante l'addizione di NaOH 5 M.

Durante questa fermentazione sono stati monitorati i parametri: densità ottica a 620 nm, concentrazione di lattosio, il peso secco della biomassa e la quantità di PHA accumulato, e la concentrazione di acido lattico.

Osservando gli andamenti riportati in Figura 6.10, ed in particolare l'OD 620 nm, si riscontra che il consorzio microbico è stato in grado di crescere utilizzando questo terreno anche senza l'addizione di cloruro d'ammonio, la fase di crescita stazionaria è stata raggiunta in 26 ore di coltura, a questo tempo di fermentazione, la concentrazione di lattosio residuo misurata è stata di 11 g/l. A 96 ore di fermentazione il lattosio residuo risultava ancora pari ad 1 g/l.

Per spiegare la crescita del consorzio occorre considerare che l'azoto necessario per la crescita dei microrganismi potrebbe essere costituito dall'azoto proteico presente nel permeato (il contenuto di azoto ammoniacale della scotta è pari a $0.01 \div 0.02$ g/l), infatti ultrafiltrando la scotta a 30 kDa, risulta essere presente un certo quantitativo residuo di proteine compreso nel range 1.4 - 2.2 g/l.

Tabella 9.15: condizioni operative della fermentazione *Scotta CN TQ*.

<i>Fermentazione</i>	<i>Scotta CN TQ</i>
<i>Tipo di microrganismo</i>	biomassa mista
<i>Terreno</i>	Permeato da scotta UF 30 kDa
<i>Tipo di inoculo</i>	inoculo da coltura di arricchimento dei fanghi
<i>Modalità di coltura</i>	batch
<i>Volume di lavoro</i>	4 l
<i>Inoculo</i>	10 % v/v
<i>OD inoculo (620 nm)</i>	$0.8 < OD_{620} < 1$
<i>Età inoculo</i>	72 h
<i>Lattosio iniziale</i>	50 g/l
<i>C/N iniziale</i>	Tal quale, non corretto
<i>Controllo di pH</i>	7 ± 0.02
<i>Controllo di T</i>	30 ± 0.2 °C
<i>Agitazione</i>	125 rpm
<i>Aerazione</i>	superficiale

Per quanto riguarda la quantità di biomassa prodotta durante la fermentazione, riportata in Tabella 9.16, il valore massimo è stato registrato a 48 ore di coltura, pari a 1.383 g/l in corrispondenza di una concentrazione di lattosio residua pari a 3 g/l.

Considerando la resa in PHA ottenuta (Tabella 9.16), è possibile osservare che a 29 e 48 ore sia pressoché identica e pari al 37.1 %, lo stesso vale per la concentrazione di PHA pari a 0.503 e 0.513 g/l, rispettivamente. Nel corso della fermentazione, a 72 ore, si registrano sia la diminuzione della

concentrazione di biomassa (1.168 g/l) che della resa (35.70 %) e conseguentemente della concentrazione di PHA (0.417 g/l).

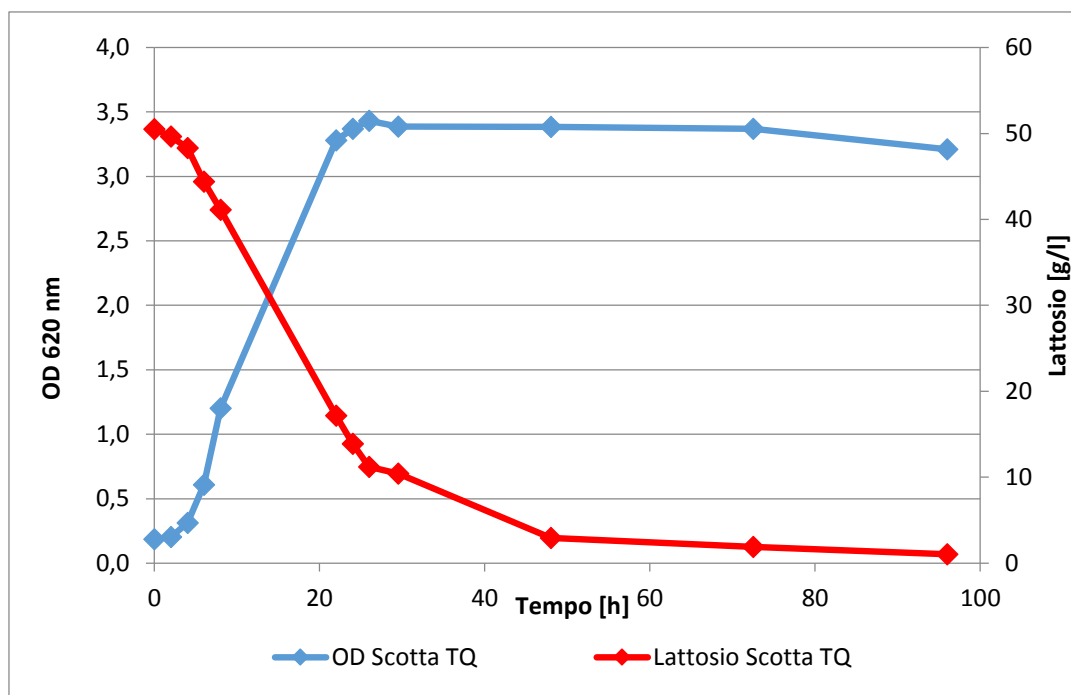


Figura 9.10: andamento di OD (620 nm) e lattosio della fermentazione Scotta CN TQ.

Per quanto riguarda l'acido lattico prodotto (Tabella 9.16), la sua concentrazione aumenta durante la fermentazione fino a raggiungere la concentrazione più elevata di 7.98 g/l a 48 ore di coltura, per scendere fino a 3.72 g/l a 72 ore.

Tabella 9.16: concentrazione di biomassa, PHA, resa e acido lattico della fermentazione Scotta CN TQ

Tempo [h]	Biomassa [g/l]	PHA [g/l]	$Y_{PHA/X}$ [%]	Acido lattico [g/l]
29	1.358	0.503	37.03	6.48
48	1.383	0.513	37.09	7.98
72	1.168	0.417	35.70	3.72

I risultati ottenuti in questa fermentazione, mostrano che è possibile utilizzare il permeato di scotta senza l'aggiunta della fonte di azoto, occorre però un confronto diretto con la fermentazione Scotta CN 50.

9.2.6 Confronto tra le fermentazioni Scotta CN TQ e Scotta CN 50

In figura 9.11 è riportato il confronto tra le due fermentazioni dal punto di vista della crescita e del consumo dei nutrienti.

La fase stazionaria di crescita viene raggiunta prima dalla fermentazione Scotta CN 50 a 24 ore, rispetto alle 26 ore della fermentazione Scotta CN TQ, in concomitanza di concentrazioni di lattosio residue di 3 e 11 g/l rispettivamente. Probabilmente la presenza di una fonte di azoto come il cloruro

d'ammonio, metabolizzabile con più facilità da parte dei microrganismi, consente al consorzio di crescere e di consumare il substrato in maniera più efficace rispetto ad una fonte di azoto come quella costituita dall'azoto proteico (derivante dalle proteine residue presenti nel permeato di scotta in un range di concentrazione pari a 1.4÷2.2 g/l); infatti nel caso della fermentazione *Scotta CN TQ* a 96 ore si ha ancora una concentrazione di lattosio residuo pari a 1 g/l.

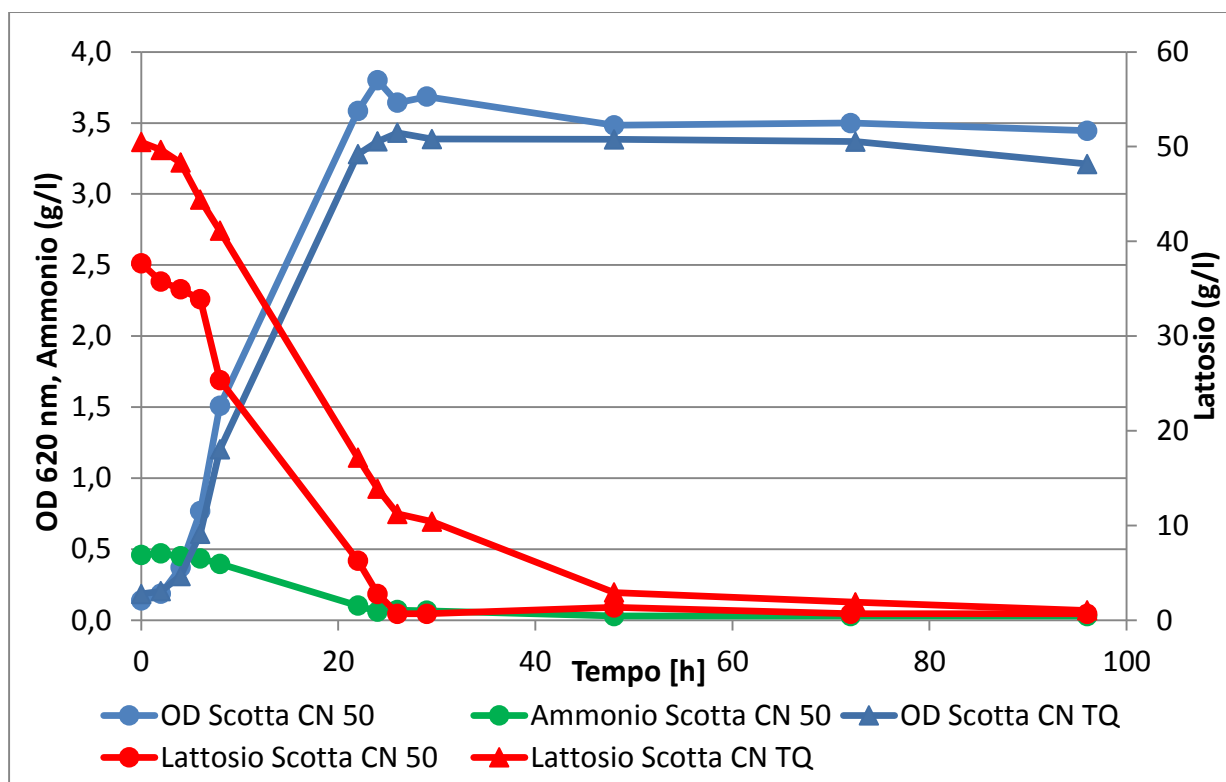


Figura 9.11 confronto delle fermentazioni *Scotta CN 50* e *Scotta CN TQ*: andamento di OD (620 nm), lattosio e ammonio

Considerando i dati riportati in tabella 9.17, è possibile osservare che la concentrazione massima di biomassa raggiunta durante la fermentazione *Scotta CN TQ* sia circa il 50 % inferiore a quella prodotta durante la fermentazione *Scotta CN 50* (1.383 e 2.687 g/l rispettivamente), inoltre la concentrazione massima ottenuta durante la fermentazione *Scotta CN TQ* è stata raggiunta a 48 ore, in ritardo rispetto alla fermentazione *Scotta CN 50* (29 ore).

Dal punto di vista delle rese e della concentrazione di PHA, risultano più elevati i valori ottenuti durante la fermentazione *Scotta CN 50*, infatti a 29 ore di coltura la resa raggiunta è del 45.77 % (1.230 g/l) contro il 37.03 % (0.503 g/l) della fermentazione *Scotta CN TQ*. Dal punto di vista della produttività la situazione risulta analoga, i valori più elevati si registrano in entrambe le fermentazioni a 29 ore ma la produttività della fermentazione *Scotta CN TQ* è inferiore al 50 % ($0.0173 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) del valore ottenuto dalla fermentazione *Scotta CN 50* ($0.0424 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$), è da notare comunque, che la produttività a 48 ore della fermentazione *Scotta CN 50* ($0.0173 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) è identica a quella ottenuta a 29 ore della fermentazione *Scotta CN TQ*.

La percentuale di PHA produttori, a 29 ore, risulta più elevata nel caso della fermentazione *Scotta CN 50* (37.5 %), mentre a 48 ore risulta più elevata nella fermentazione *Scotta CN TQ* (42.6 %), a 72 ore di fermentazione invece la percentuale di PHA produttori risulta prossima al 37 % in entrambe le fermentazioni.

Tabella 9.17: concentrazione di biomassa, PHA, resa e produttività delle fermentazione Scotta CN 50 e Scotta CN TQ.

Fermentazione	Tempo [h]	Biomassa [g/l]	PHA [g/l]	$Y_{PHA/X}$ [%]	Produttività PHA [$g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$]	PHA Produttori [%]
Fermentazione Scotta TQ	29	1.358	0.503	37.03	0.0173	30.1
	48	1.383	0.513	37.09	0.0106	42.6
	72	1.168	0.417	35.70	0.0057	36.7
Fermentazione Scotta CN 50	29	2.687	1.230	45.77	0.0424	37.5
	48	2.127	0.832	39.11	0.0173	13.9
	72	2.110	0.967	45.83	0.0134	37.8

Concludendo, l'aggiunzione di cloruro di ammonio per correggere il CN iniziale a 50, consente di ottenere concentrazioni di biomassa maggiori, che si traducono in concentrazioni di PHA più elevate, consente inoltre di ottenere valori massimi in tempi anticipati (29 ore) rispetto alla fermentazione con permeato di scotta senza addizione di cloruro d'ammonio.

Occorre considerare, comunque, che i risultati ottenuti in quest'ultima fermentazione Scotta CN TQ sono incoraggianti, ed inoltre, il terreno di coltura risulta essere più economico senza l'aggiunta di cloruro d'ammonio, è stato quindi deciso di condurre i successivi test di fermentazione impiegando scotta non trattata e quindi non delipidizzata ne deproteinata, per valutare l'impiego di un terreno, da un lato, ancora più economico, dall'altro contenente un quantitativo di azoto proteico più elevato, in maniera da valutare l'influenza di quest'ultima componente sulla crescita e sulla produzione di PHA da parte del consorzio microbico.

9.2.7 Fermentazione con scotta non pretrattata

Per l'allestimento di questa fermentazione è stata utilizzata scotta filtrata (attraverso un tessuto di nylon con fibre da 20 den, come descritto in 8.5.1), ma che non ha subito i processi di delipidizzazione e deproteinazione attraverso i pretrattamenti descritti nel paragrafo 8.5 (precipitazione termocalcica, microfiltrazione ed ultrafiltrazione). La concentrazione di lipidi presenti è di circa 1 g/l mentre quella di proteine di circa 3.5 g/l. L'ammonio è presente in una concentrazione prossima a 0.02 g/l; la fermentazione è stata condotta senza alcuna correzione del rapporto C/N iniziale della scotta.

Le condizioni operative sono riepilogate in Tabella 9.18: la temperatura ed il pH sono stati controllati a 30 ± 0.2 °C e 7 ± 0.02 rispettivamente, quest'ultimo è stato corretto mediante l'aggiunzione di NaOH 5 M.

Durante la fermentazione sono stati monitorati i parametri: densità ottica a 620 nm, concentrazione di lattosio, il peso secco della biomassa e la quantità di PHA accumulato, la concentrazione di acido lattico e di acido acetico.

Osservando gli andamenti riportati in Figura 9.12, ed in particolar modo l'OD 620 nm, si riscontra che il consorzio microbico è stato in grado di crescere utilizzando come terreno la scotta non pretrattata, quindi in presenza di lipidi e proteine, senza l'aggiunzione di cloruro d'ammonio.

La fase di crescita stazionaria è stata raggiunta a 22 ore di coltura, in corrispondenza di una concentrazione di lattosio residuo pari a 26 g/l; l'esaurimento del lattosio è stato raggiunto a 72 ore di fermentazione (0.72 g/l).

Tabella 9.18: condizioni operative della fermentazione Scotta NT.

<i>Fermentazione</i>	<i>Scotta NT</i>
<i>Tipo di microrganismo</i>	biomassa mista
<i>Terreno</i>	Scotta non pretrattata
<i>Tipo di inoculo</i>	inoculo da coltura di arricchimento dei fanghi
<i>Modalità di coltura</i>	batch
<i>Volume di lavoro</i>	4 l
<i>Inoculo</i>	10 % v/v
<i>OD inoculo (620 nm)</i>	$0.8 < OD_{620} < 1$
<i>Età inoculo</i>	72 h
<i>Lattosio iniziale</i>	46 g/l
<i>C/N iniziale</i>	Tal quale, non corretto
<i>Controllo di pH</i>	7 ± 0.02
<i>Controllo di T</i>	30 ± 0.2 °C
<i>Agitazione</i>	125 rpm
<i>Aerazione</i>	superficiale

Per quanto riguarda la quantità di biomassa prodotta durante la fermentazione, riportata in Tabella 9.19, si osserva come la concentrazione cresca progressivamente durante la fermentazione, il valore massimo è stato registrato a 72 ore di coltura, pari a 1.981 g/l in corrispondenza di una concentrazione di lattosio residua pari a 0.72 g/l. Questo andamento della crescita di biomassa, potrebbe essere imputato alla maggiore concentrazione di azoto proteico disponibile per il consorzio, trattandosi di una scotta non deproteinata.

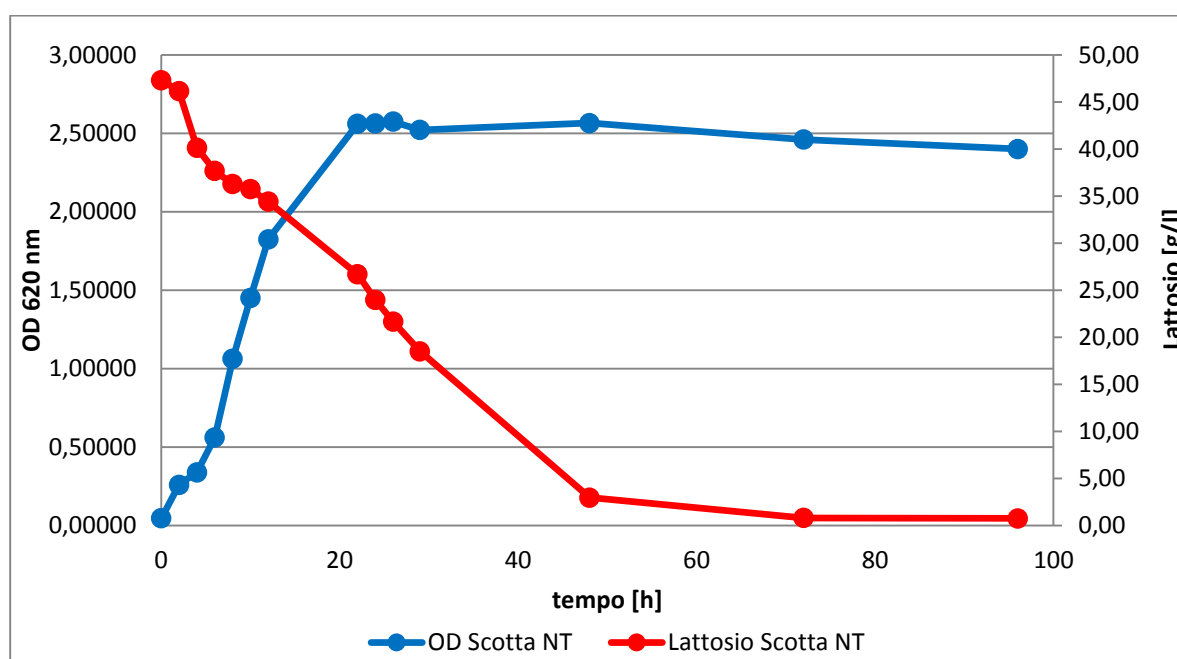


Figura 9.12: andamento di OD (620 nm) e lattosio, della fermentazione Scotta NT.

Considerando i dati riportati in Tabella 9.19 riguardo le rese in PHA ottenute, è possibile osservare come il valore massimo (64.69 %) sia stato raggiunto a 24 ore di fermentazione; le concentrazioni più elevate di PHA, sono state raggiunte a 29 e 48 ore di fermentazione, pari a 0.951 e 1.093 g/l rispettivamente.

Durante questa fermentazione, inoltre, è stato prodotto un consistente quantitativo di acido lattico, la concentrazione massima raggiunta è stata di 16.82 g/l a 72 ore di fermentazione; è stata inoltre determinata la produzione di acido acetico, la concentrazione massima raggiunta è stata di 7.65 g/l a 72 ore come nel caso dell'acido lattico; la produzione di acidi organici (unitamente alla presenza di modeste quantità di etanolo riscontrate nella brodocoltura) dimostra che nel consorzio microbico sono presenti batteri lattici eterofermentanti, pertanto il consumo di substrato, le rese e le concentrazioni di PHA ottenute, risultano condizionate dalla produzione di altri metaboliti.

A questo punto occorrerà valutare, se abbinare al processo di recupero dei PHA, anche un recupero degli acidi organici dalla brodocoltura, in maniera da migliorare l'economia di processo, oppure sfruttare la presenza di questi acidi organici, metabolizzabili dai microrganismi per la sintesi di PHA, al fine di incrementare la produttività delle fermentazioni.

Tabella 9.19: concentrazione di biomassa, PHA, resa, acido lattico e acetico della fermentazione Scotta NT

Tempo [h]	Biomassa [g/l]	PHA [g/l]	$Y_{PHA/X}$ [%]	Acido lattico [g/l]	Acido acetico [g/l]
24	1.470	0.951	64.69	6.78	5.04
29	1.678	0.707	42.16	8.39	5.58
48	1.884	1.093	58.03	15.69	7.39
72	1.981	0.774	39.09	16.82	7.65

9.2.8 Confronto tra le fermentazioni Scotta CN TQ e Scotta NT

In questo paragrafo si discute il confronto tra le ultime due fermentazioni presentate, la differenza principale risiede nell'assenza del pretrattamento della fermentazione Scotta NT, che comporta la presenza di una maggiore concentrazione di lipidi e proteine rispetto alla fermentazione Scotta CN TQ, allestita con permeato ottenuto da ultrafiltrazione (30 kDa).

Osservando gli andamenti riportati in Figura 9.13 relativi all'OD 620 nm ed alla concentrazione di lattosio nelle due fermentazioni, è possibile osservare, come la fase stazionaria sia stata raggiunta prima (22 ore) dalla fermentazione Scotta NT in corrispondenza di una concentrazione di lattosio di circa 26 g/l, mentre nel caso della fermentazione Scotta CN TQ, la fase stazionaria sia stata raggiunta a 26 ore in corrispondenza di una concentrazione di lattosio di 11 g/l; a 72 ore di coltura, il lattosio risulta pressoché esaurito in entrambe le fermentazioni, con valori prossimi ad 1 g/l.

Considerando i dati riportati in tabella 9.20, è possibile osservare che la concentrazione di biomassa misurata durante la fermentazione Scotta NT è costantemente maggiore rispetto alla fermentazione Scotta CN TQ, questo fatto, potrebbe essere dovuto alla maggior concentrazione di azoto proteico disponibile nella Scotta non pretrattata.

Dal punto di vista delle rese e della concentrazione di PHA si registrano, nuovamente, valori più elevati nella fermentazione Scotta NT, la resa massima viene raggiunta in entrambe le fermentazioni a 48 ore, ma mentre nella fermentazione Scotta CN TQ si ottiene il 37.09 %, nell'altra fermentazione si raggiunge il 58.03 %, conseguentemente sia per via della maggior resa sia per via della

concentrazione di biomassa più elevata, la concentrazione di polimero raggiunta dalla fermentazione *Scotta NT* (1.093 g/l) è doppia rispetto alla fermentazione *Scotta CN TQ* (0.513 g/l).

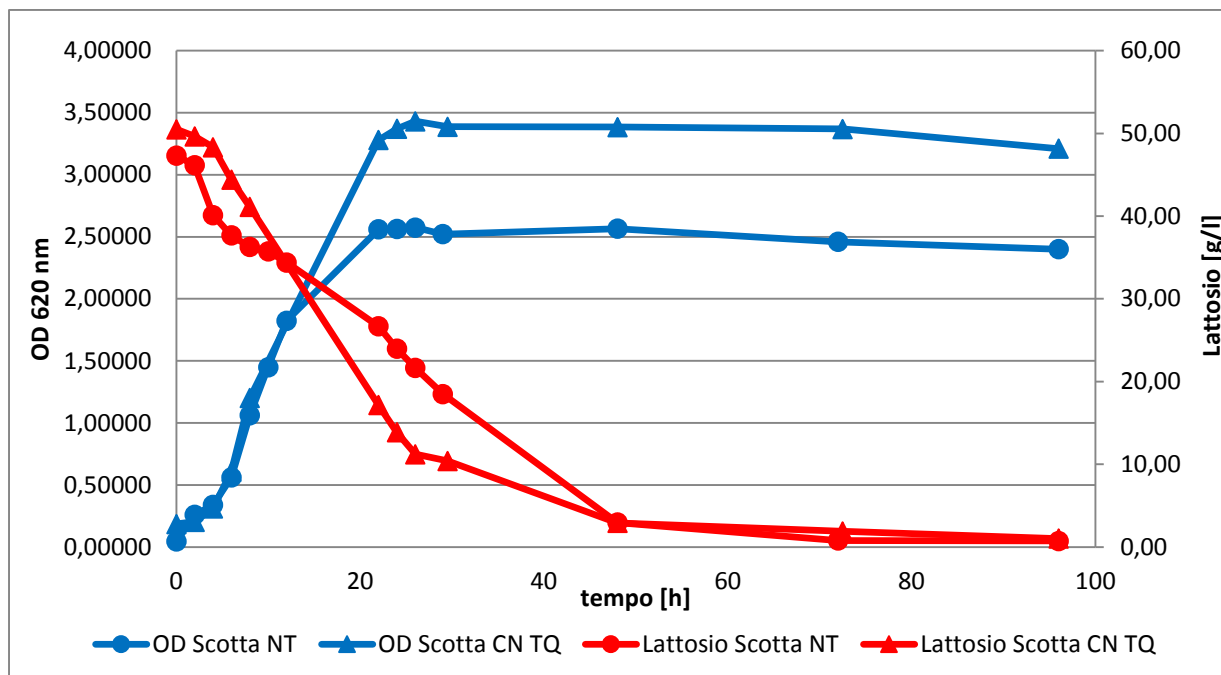


Figura 9.13 confronto delle fermentazioni *Scotta CN TQ* e *Scotta NT*: andamento di OD (620 nm), lattosio.

Riguardo la produttività in PHA, si registrano i valori massimi a 29 ore in entrambe le fermentazioni, in ogni caso, il valore raggiunto dalla fermentazione *Scotta NT* è superiore ($0.0244 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) rispetto alla fermentazione *Scotta CN TQ* ($0.0173 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Tabella 9.20: concentrazione di biomassa, PHA, resa e produttività delle fermentazione *Scotta CN TQ* e *Scotta NT*.

Fermentazione	Tempo [h]	Biomassa [g/l]	PHA [g/l]	$Y_{\text{PHA/X}}$ [%]	Produttività PHA [$\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]
Fermentazione <i>Scotta CN TQ</i>	29	1.358	0.503	37.03	0.0173
	48	1.383	0.513	37.09	0.0106
	72	1.168	0.417	35.70	0.0057
Fermentazione <i>Scotta NT</i>	29	1.678	0.707	42.16	0.0244
	48	1.884	1.093	58.03	0.0228
	72	1.981	0.774	39.09	0.0111

Concludendo, l'utilizzo di scotta non pretrattata ha comportato un vantaggio rispetto all'impiego del permeato di scotta senza correzione del C/N iniziale, per tale motivo, nel prossimo paragrafo, verrà presentata una fermentazione in cui sarà utilizzato come terreno scotta non pretrattata e modalità di fermentazione *fed-batch*. Lo scopo di questo test, è di valutare l'influenza della modalità di coltura (*fed-batch*), sulla crescita della biomassa e sulla produzione di PHA e, in particolare, se l'adattamento del consorzio microbico per 24 ore in un terreno costituito da scotta non pretrattata consenta di ottenere una crescita ed un accumulo di PHA maggiori rispetto alle condizioni di coltura *batch*.

9.2.9 Fermentazione con scotta non pretrattata *fed-batch*

In questa fermentazione è stata nuovamente utilizzata scotta tal quale, filtrata (attraverso un tessuto di nylon con fibre da 20 den), senza correzione del C/N iniziale a 50.

Le condizioni operative della fermentazione sono riassunte in Tabella 9.21: la temperatura ed il pH sono stati controllati a 30 ± 0.2 °C e 7 ± 0.02 rispettivamente, quest'ultimo è stato corretto mediante l'aggiunta di NaOH 5 M.

Durante la fermentazione sono stati monitorati i parametri: densità ottica a 620 nm, concentrazione di lattosio, il peso secco della biomassa e la quantità di PHA accumulato, la concentrazione di acido lattico e di acido acetico.

Tabella 9.21: condizioni operative della fermentazione Scotta FB

Fermentazione	Scotta FB
<i>Tipo di microrganismo</i>	biomassa mista
<i>Terreno</i>	Scotta non pretrattata
<i>Tipo di inoculo</i>	inoculo da coltura di arricchimento dei fanghi
<i>Modalità di coltura</i>	Fed-batch: sostituzione del 90 % del volume di coltura con terreno fresco
<i>Volume di lavoro</i>	4 l
<i>Inoculo</i>	10 % v/v
<i>OD inoculo (620 nm)</i>	$0.8 < OD_{620} < 1$
<i>Età inoculo</i>	72 h
<i>Lattosio iniziale</i>	48 g/l
<i>C/N iniziale</i>	Tal quale, non corretto
<i>Controllo di pH</i>	7 ± 0.02
<i>Controllo di T</i>	30 ± 0.2 °C
<i>Agitazione</i>	125 rpm
<i>Aerazione</i>	superficiale

Osservando gli andamenti riportati in Figura 9.14, ed in particolar modo l'OD 620 nm, si riscontra che la fase di crescita stazionaria della fase batch è stata raggiunta a 22 ore di fermentazione, in corrispondenza di una concentrazione di lattosio prossima a 25 g/l, successivamente alle 24 ore è stato effettuato il fed-batch, consistente nella sostituzione del 90 % del volume di coltura con terreno fresco, mantenendo il 10 % del volume originario come inoculo.

La biomassa adattatasi per 24 ore alla scotta, ha raggiunto la nuova fase stazionaria in sole 10 ore, in corrispondenza di una concentrazione di lattosio di 36 g/l. In questa fase, è stato deciso di proseguire la coltura per 48 ore in maniera di valutare l'accumulo di PHA da parte dei microrganismi ed effettuare un nuovo fed-batch a 48 ore, in modo che il lattosio in coltura non fosse ancora esaurito e quindi non subentrassero fenomeni di degradazione del polimero accumulato.

Nella seconda fase fed-batch la coltura ha nuovamente raggiunto la fase stazionaria in 10 ore, in corrispondenza di una concentrazione di lattosio pari a 36 g/l, la coltura è stata fatta proseguire per 24 ore, dopodiché è stata sacrificata.

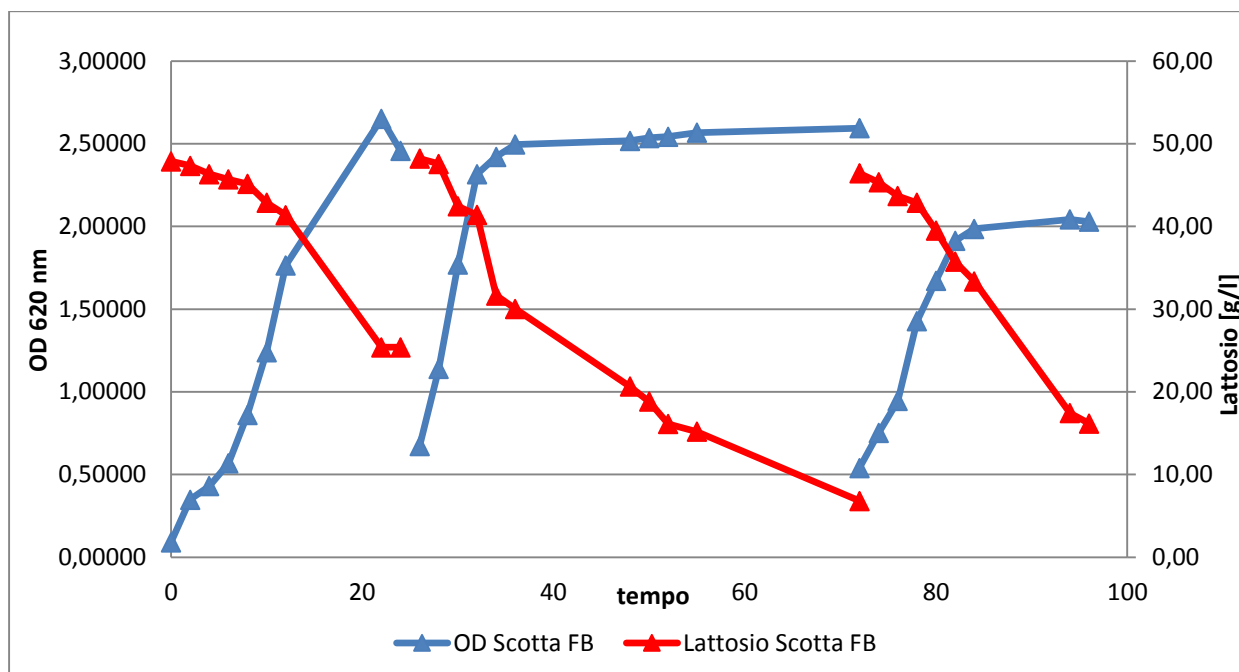


Figura 9.14: andamento di OD (620 nm) e lattosio, della fermentazione Scotta FB.

Considerando le concentrazioni di biomassa riportate in Tabella 9.22, è possibile osservare come a 24 ore della fase batch, il valore registrato, pari a 0.635 g/l, non sia molto elevato, mentre con le fasi fed-batch la crescita della biomassa migliora, raggiungendo 1.562 g/l a 24 ore del fed-batch 1 e 1.462 g/l del fed-batch 2.

Dal punto di vista delle rese occorre osservare come queste risultino inferiori nelle due fasi fed-batch, rispetto alla prima fase batch, mentre le concentrazioni di PHA ottenute risultino più elevate nelle fasi fed-batch, grazie alla maggiore concentrazione di biomassa ottenuta. La concentrazione più elevata è stata registrata a 24 ore del secondo fed-batch con un valore pari a 0.472 g/l, mentre a 24 ore del primo fed-batch erano stati ottenuti 0.438 g/l.

Anche in questa fermentazione è stata registrata una certa produzione di acidi organici: le massime concentrazioni di acido acetico e di acido lattico sono state raggiunte a 48 ore del secondo fed-batch e sono pari a 7.45 g/l e 14.06 g/l rispettivamente.

Tabella 9.22: concentrazione di biomassa, PHA, resa, acido lattico e acetico della fermentazione Scotta FB

Tempo [h]	Biomassa [g/l]	PHA [g/l]	$Y_{PHA/X}$ [%]	Acido lattico [g/l]	Acido acetico [g/l]
24	0.635	0.397	62.65	6.67	6.06
24 Fed-batch 1	1.562	0.438	28.07	8.12	5.82
29 Fed batch 1	1.518	0.352	23.22	9.42	6.36
48 Fed batch 1	1.285	0.323	25.16	14.06	7.45
24 Fed-batch 2	1.462	0.472	32.25	8.02	5.59

Concludendo, occorre notare che le prestazioni, in termini di rese, produttività e biomassa, ottenute in questa fermentazione da parte del consorzio microbico, sono inferiori rispetto alla fermentazione *Scotta NT*, pertanto nel prossimo paragrafo si procederà ad un confronto dettagliato.

9.2.10 Confronto tra le fermentazioni *Scotta NT* e *Scotta FB*

In questo paragrafo è discusso il confronto le ultime due fermentazioni presentate che differiscono non più per il terreno impiegato ma per la modalità di fermentazione: la fermentazione *Scotta NT* di tipo batch e la fermentazione *Scotta FB* di tipo fed-batch.

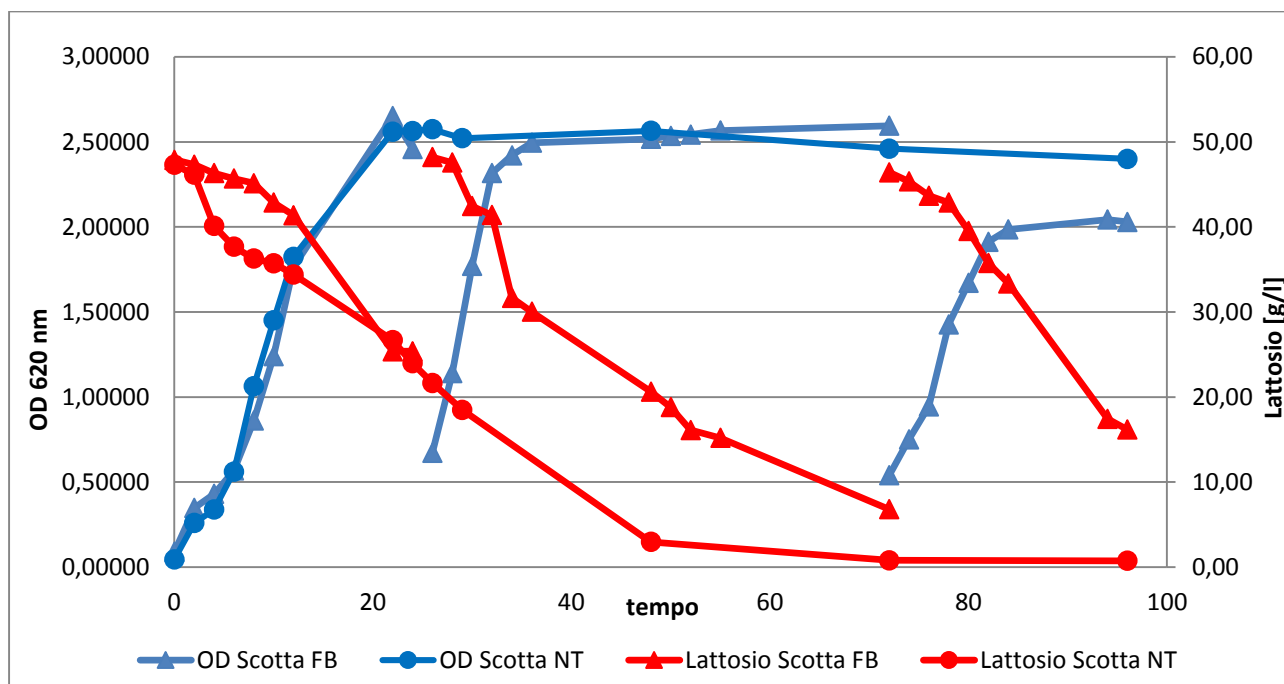


Figura 9.15 confronto delle fermentazioni *Scotta NT* e *Scotta FB*: andamento di OD (620nm), lattosio.

Osservando gli andamenti riportati in Figura 9.15 relativi all'OD 620 nm ed alla concentrazione di lattosio delle due fermentazioni nella fase batch, è possibile osservare, come la fase stazionaria sia stata raggiunta contemporaneamente a 22 ore durante le due fermentazioni in corrispondenza di una concentrazione di lattosio di circa 24-25 g/l.

Le fasi fed-batch, della fermentazione *Scotta FB*, invece, mostrano come il consorzio, adattatosi alla scotta per 24 ore, sia in grado di crescere più velocemente, raggiungendo la fase stazionaria di crescita in sole 10 ore.

Per quanto riguarda la concentrazione della biomassa (Tabella 9.23), confrontando le prime 24 della fase batch, la fermentazione *Scotta FB* ha prodotto risultati migliori, raggiungendo una concentrazione di 1.678 g/l contro lo 0.635 g/l della fermentazione *Scotta FB*, tuttavia i fed-batch di quest'ultima fermentazione hanno consentito di ottenere concentrazioni di biomassa (1.562 e 1.462 g/l del Fed-batch 1 e 2 rispettivamente) prossime a quelle ottenute dalla fermentazione *Scotta NT* a 24 ore.

Dal punto di vista della resa, fatto salvo per il valore del 62.65 % ottenuto nelle prime 24 ore della fermentazione *Scotta FB*, i valori ottenuti dalla fermentazione *Scotta NT* sono superiori, un discorso

analogo è valido per le concentrazioni di polimero ottenute, il valore massimo registrato durante la fermentazione *Scotta NT* è stato di 1.981 g/l a 72 ore, contro gli 0.472 g/l alle 24 ore del secondo Fed-batch della fermentazione *Scotta FB*

Riguardo la produttività in PHA, durante la fermentazione *Scotta NT* si registra un valore massimo di 0.0244 g l⁻¹ h⁻¹ a 29 ore, mentre il valore massimo raggiunto dalla fermentazione *Scotta FB* è di 0.0197 g l⁻¹ h⁻¹ a 24 ore del secondo fed-batch; in ogni caso le produttività ottenute durante la fermentazione *Scotta FB* si mantengono costantemente inferiori rispetto alla precedente fermentazione *Scotta NT*. Occorre comunque considerare che i fed-batch hanno consentito una ripresa dal punto di vista della crescita della biomassa e della produzione di PHA della fermentazione *Scotta FB*, che nelle prime 24 ore batch aveva prodotto risultati di entità modesta.

Tabella 9.23: concentrazione di biomassa, PHA, resa e produttività delle fermentazione Scotta NT e Scotta FB.

Fermentazione	Tempo [h]	Biomassa [g/l]	PHA [g/l]	Y_{PHA/X} [%]	Produttività PHA [g*l⁻¹*h⁻¹]
Fermentazione <i>Scotta NT</i>	29	1.678	0.707	42.16	0.0244
	48	1.884	1.093	58.03	0.0228
	72	1.981	0.774	39.09	0.0111
Fermentazione <i>Scotta FB</i>	24	0.635	0.397	62.65	0.0165
	24 Fed-batch 1	1.562	0.438	28.07	0.0183
	29 Fed batch 1	1.518	0.352	23.22	0.0121
	48 Fed batch 1	1.285	0.323	25.16	0.0067
	24 Fed-batch 2	1.462	0.472	32.25	0.0197

In conclusione, è stato quindi dimostrato come questo consorzio sia in grado di utilizzare sia la scotta pretrattata che quella non pretrattata sia dal punto di vista della crescita microbica sia dal punto di vista della produzione di PHA, con alcune differenze in termini di rapidità a raggiungere la fase stazionaria di crescita ed in termini di resa e produttività; in particolare quest'ultima grandezza registra a 29 ore della fermentazione *Scotta NT* il valore massimo.

Per questi motivi ed al fine di confermare i dati ottenuti su scala di laboratorio, si è quindi deciso di effettuare uno scale-up in un impianto pilota che consenta di processare volumi superiori a 500 l.

9.3 Fermentazioni condotte su scala pilota

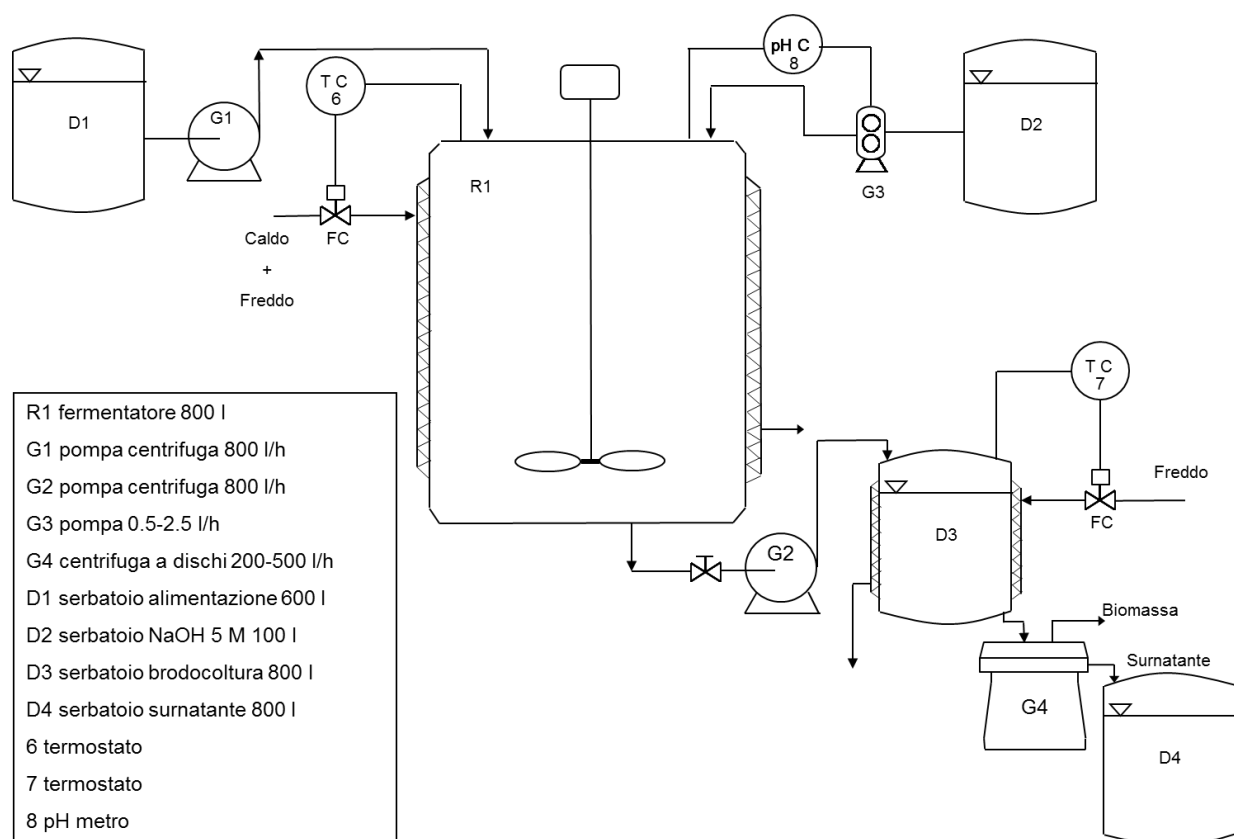


Figura 9.16: P&ID dell'impianto di fermentazione su scala pilota.

In figura 9.16 è rappresentato lo schema P&ID dell'impianto pilota di fermentazione. Esso è costituito da un fermentatore (R1) agitato meccanicamente e dotato di una camicia per il controllo della temperatura di processo. A servizio del fermentatore sono presenti 4 serbatoi:

- Serbatoio (D1) per lo stoccaggio e l'alimentazione del prodotto da fermentare.
- Serbatoio (D2) della soluzione necessaria alla correzione del pH (NaOH 5 M).
- Serbatoio (D3) per lo stoccaggio (in condizioni refrigerate) della brodocoltura.
- Serbatoio (D4) per lo stoccaggio del surnatante ottenuto dalla separazione della brodocoltura.

Per la movimentazione dei fluidi di processo sono presenti tre pompe:

- Pompa centrifuga (G1) per il carico del prodotto da fermentare nel reattore.
- Pompa centrifuga (G2) per il carico del serbatoio di stoccaggio della brodocoltura.
- Pompa peristaltica (G3) per l'alimentazione della soluzione basica necessaria alla correzione del pH.

Per la separazione della biomassa dalla brodocoltura è presente una centrifuga:

- Centrifuga di tipo continuo a dischi (G4).

Sono presenti inoltre due sistemi di controllo della temperatura: uno del fermentatore (R1) ed uno del serbatoio di stoccaggio del surnatante di fermentazione (D3); infine è presente il controllo di pH del fermentatore (R1).

L'impianto è stato realizzato con apparecchiature normalmente utilizzate nei processi dell'industria casearia: quale reattore di fermentazione (R1) è stata impiegata una fermentiera di volume pari a 800 l, dotata di un agitatore ad ancora rovesciata e di un frangiflutto saldato al fondo che incrementa il rimescolamento del liquido; quale serbatoio refrigerato (D4) è stato utilizzato un

refrigeratore industriale di volume pari a 800 l, che consente di raggiungere la temperatura di 4 °C; per la separazione della biomassa dalla brodocoltura è stata impiegata una centrifuga industriale di tipo continuo a dischi, in grado di processare 200-500 l/h, operante ad una velocità di 9600 rpm. I restanti serbatoi e le pompe sono del tipo normalmente utilizzato nell'industria di processo.

L'impiego di un consorzio microbico nella fermentazione, ha consentito di condurre tutte le operazioni senza controllo di sterilità.

9.3.1 Scale-up del processo

Lo scale-up del processo ha interessato le tre fasi principali che lo costituiscono:

- Espansione dell'inoculo.
- Fermentazione del sottoprodotto caseario.
- Separazione della biomassa dalla brodocoltura.

I criteri adottati per lo scale-up dell'inoculo sono stati:

- Mantenimento del rapporto tra il volume di inoculo ed il volume finale della coltura di espansione.
- Mantenimento delle condizioni dell'inoculo (colture in fase di crescita esponenziale).
- Mantenimento del tipo di terreno impiegato: terreno sintetico *Khardenavis* (fonte di carbonio acido acetico).
- Mantenimento delle condizioni di coltura: temperatura (controllata a 30 °C), pH (7 iniziale), aerazione (superficiale), agitazione.

I criteri adottati per lo scale-up della fermentazione del sottoprodotto caseario sono stati:

- Mantenimento del rapporto tra il volume di inoculo ed il volume finale della fermentazione.
- Mantenimento delle condizioni dell'inoculo (colture in fase di crescita esponenziale).
- Mantenimento del tipo di terreno impiegato: scotta non pretrattata.
- Mantenimento delle condizioni di coltura: temperatura (controllata a 30 °C), pH (controllato a 7), aerazione (superficiale), agitazione.

I criteri adottati per lo scale-up della separazione della biomassa dalla brodocoltura sono stati:

- Mantenimento del valore dell'accelerazione di gravità necessario per ottenere un concentrato di tipo "pompabile".

9.3.2 Prova Idraulica

Al fine di valutare la funzionalità dell'impianto pilota, è stata condotta una prova idraulica preliminare, simulando le condizioni operative adottate in fase di fermentazione. Lo scopo è stato quello di valutare l'efficienza sia dell'agitazione sia del controllo di temperatura del reattore.

Questa prova è stata effettuata a due diversi riempimenti del reattore, utilizzando acqua al fine di simulare le due differenti fasi di lavoro della fermentazione:

- La prima fase di coltura costituita dall'espansione dell'inoculo, effettuata con terreno sintetico, durante la quale il volume operativo previsto è di 100 l.
- La seconda fase di coltura, costituita dalla fermentazione con scotta, durante la quale il volume operativo previsto è di 600 l.

La temperatura del reattore è regolata tramite acqua (calda/fredda all'occorrenza) circolante in camicia. Il riscaldamento del fluido di servizio avviene mediante un bruciatore a gasolio, mentre il raffreddamento è gestito mediante l'immissione di acqua di pozzo ($T = 14\text{ }^{\circ}\text{C}$), il mantenimento della temperatura di esercizio ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$) è realizzato mediante impostazione del valore di set-point del bruciatore.

L'agitazione del reattore, ottenuta mediante un agitatore ad ancora rovesciata, che ruota a velocità costante di 20 rpm, si è rivelata idonea, anche tenendo conto della presenza di un frangiflutto, saldato al fondo, che incrementa il rimescolamento del liquido.

Sono stati determinati i seguenti valori ottimali di set-point di accensione del bruciatore, per il mantenimento della temperatura all'interno del reattore a $30 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$:

- $T = 29.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ con riempimento di 100 l.
- $T = 30.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ con riempimento di 600 l.

9.3.3 Primo test di fermentazione: modalità batch

L'inoculo utilizzato in questa fermentazione ha subito due espansioni:

- Un prima dalle beute (200 ml) al reattore su scala di laboratorio (5 l).
- Una seconda dal reattore su scala di laboratorio (5 l) al reattore su scala pilota (100 l).

Per entrambe le espansioni è stato utilizzato il terreno sintetico *Khardenavis* con fonte di carbonio costituita da acido acetico. Le condizioni operative dell'espansione su scala pilota sono riportate in tabella 6.24.

La temperatura è stata controllata a 30 con la precisione di $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, mentre il pH, corretto inizialmente a 7 ± 0.3 con soda (circa 1 kg, in pastiglie) non è stato controllato durante la fermentazione.

Tabella 9.24: condizioni operative dell'espansione dell'inoculo su scala pilota

<i>Fermentazione</i>	<i>Espansione Pilota 1</i>
Tipo di microrganismo	biomassa mista
Terreno	Sintetico, Khardenavis
Tipo di inoculo	Consorzio espanso in reattore scala laboratorio
Modalità di coltura	Batch
Volume di lavoro	100 l
Età inoculo	Coltura in fase di crescita esponenziale
Acido acetico iniziale	20 g/l
C/N iniziale	50
Controllo di pH	7 ± 0.5
Controllo di T	$30 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$
Agitazione	20 rpm (agitatore ad ancora rovesciata)
Aerazione	Superficiale

La durata complessiva della fase di espansione, nel fermentatore pilota, è stata di 21 ore, necessarie per raggiungere la concentrazione di microrganismi sufficiente a costituire l'inoculo della successiva fase di fermentazione con scotta. Al termine di questa prima fase, 70 l di coltura sono stati utilizzati per inoculare circa 500 l di Scotta.

La scotta, pervenuta alla temperatura di $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ (poiché direttamente proveniente dal processo di produzione della ricotta), è stata addizionata gradualmente in modo da mantenere la temperatura del reattore costante a $30 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Le condizioni di lavoro della fase di fermentazione con scotta, condotta in modalità batch, sono riepilogate in Tabella 9.25.

Durante questa fase di fermentazione, della durata complessiva di 48 ore, la temperatura è stata controllata a 30 ± 1 °C ed il pH è stato controllato a 7 ± 0.5 mediante l'aggiunta di soluzione di NaOH 5 M (di cui sono stati consumati complessivamente 40 l nell'arco delle 48 ore).

I parametri monitorati sono stati: la densità ottica a 620 nm, la concentrazione di biomassa e la concentrazione di lattosio residuo in coltura (Figura 9.17).

Tabella 9.25: condizioni operative della fermentazione batch con scotta Pilota 1

<i>Fermentazione</i>	<i>Pilota 1</i>
<i>Tipo di microrganismo</i>	biomassa mista
<i>Terreno</i>	Scotta non pretrattata
<i>Tipo di inoculo</i>	Da espansione reattore pilota
<i>Modalità di coltura</i>	Batch
<i>Volume di lavoro</i>	600 l
<i>Inoculo</i>	10 % v/v
<i>Età inoculo</i>	21 h
<i>Lattosio iniziale</i>	47 g/l
<i>C/N iniziale</i>	Tal quale, non corretto
<i>Controllo di pH</i>	7 ± 0.3 °C controllato manualmente ogni 20' con NaOH 5 M
<i>Controllo di T</i>	30 ± 1 °C
<i>Agitazione</i>	20 rpm (agitatore ad ancora rovesciata)
<i>Aerazione</i>	superficiale

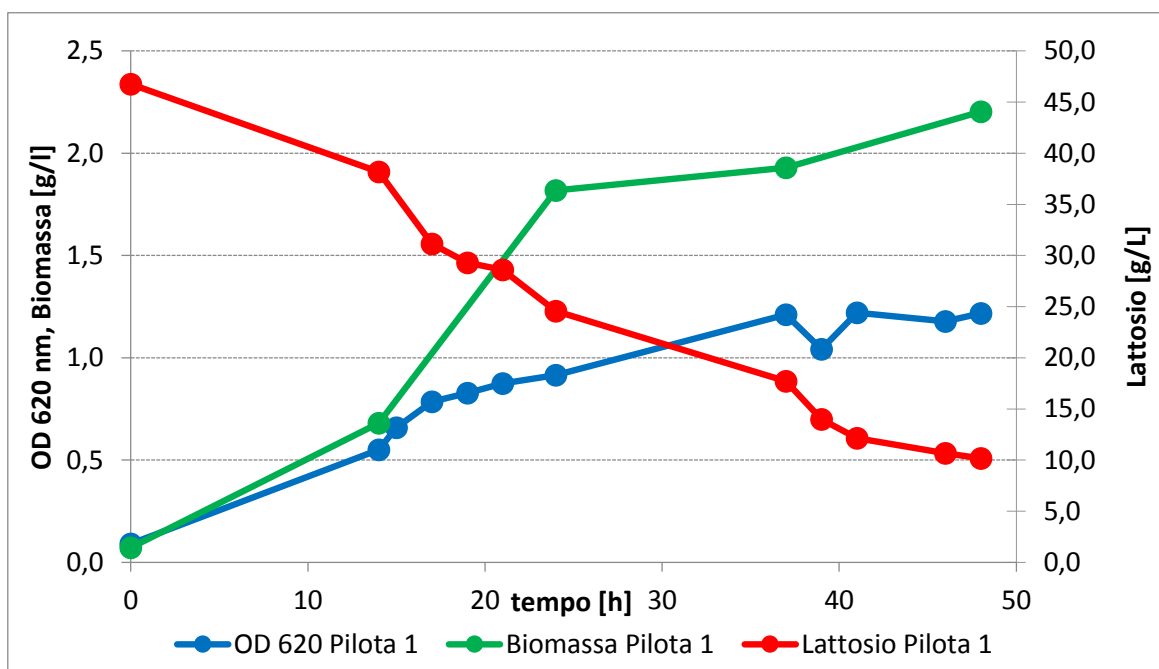


Figura 9.17: andamento di OD (620 nm), biomassa, lattosio, della fermentazione Pilota 1.

Per quanto riguarda la crescita della biomassa, è possibile osservare sia dall'andamento della densità ottica misurata a 620 nm, sia dalla sua concentrazione, che non si raggiunge la fase di crescita stazionaria; a circa 24 ore di fermentazione si raggiunge, però, la fase di decelerazione, alla quale corrisponde una concentrazione di biomassa pari a 1.818 g/l, nelle successive 24 ore la concentrazione continua a crescere, seppur lentamente fino a 2.203 g/l raggiunti a 48 ore.

Per quanto riguarda il consumo di lattosio, al momento dell'inoculo della coltura, la concentrazione misurata è stata di 46.76 g/l, mentre a 24 ore di fermentazione, la concentrazione è scesa a 24.58 g/l, corrispondente ad un consumo di 22.2 g/l. A 48 ore di coltura la concentrazione di lattosio residuo è stata di 10.15 g/l, corrispondente ad un consumo di 36.6 g/l. La massima resa della biomassa riferita al substrato (Tabella 9.26) è stata raggiunta a 24 ore con un valore pari al 7.86 %.

Per quanto riguarda la produzione di PHA (Tabella 9.26) è possibile osservare che la massima concentrazione di polimero, pari a 1.04 g/l, è stata raggiunta a 24 ore, corrispondente anche alla resa massima riferita alla biomassa pari al 57.1 % ed alla resa massima riferita al substrato pari a 2.68 %. Riguardo la produttività oraria di PHA, il valore più elevato raggiunto è pari a 0.0247 [g l⁻¹ h⁻¹], ottenuto anch'esso a 24 ore di fermentazione.

Tabella 9.26: valori di biomassa, PHA, $Y_{PHA/X}$, produttività, $Y_{X/S}$, $Y_{PHA/S}$ della fermentazione Pilota 1.

Tempo [h]	Biomassa [g/l]	$Y_{X/S}$ % [g_{biomassa} * g_{lattosio}⁻¹]	PHA [g/l]	$Y_{PHA/X}$ % [g_{PHA} * g_{biomassa}⁻¹]	$Y_{PHA/S}$ % [g_{PHA} * g_{lattosio}⁻¹]	Produttività PHA [g * l⁻¹ * h⁻¹]
14	0.68	7.08	0.36	52.6	n.c.	n.c.
24	1.82	7.86	1.04	57.1	2.68	0.0247
37	1.93	6.39	0.97	50.4	1.82	0.0142
48	2.20	5.82	0.97	43.8	1.42	0.0108

Considerando i risultati ottenuti, ed in particolare il raggiungimento della massima concentrazione di PHA, della massima resa riferita sia alla biomassa che al substrato e della massima produttività a 24 ore, si è deciso di effettuare un secondo test di fermentazione in modalità fed-batch, in maniera da valutare se fosse possibile incrementare ulteriormente la produzione di PHA, sfruttando l'adattamento della biomassa alla scotta nella prima fase della fermentazione.

9.3.4 Secondo test di fermentazione: modalità fed-batch

Durante questo secondo test, le fasi di preparazione dell'inoculo e di espansione da 5 a 100 l sono state condotte secondo le stesse modalità e con lo stesso terreno utilizzato nella prima prova.

Il fed-batch è stato effettuato sostituendo a 24 ore di fermentazione il 90 % del volume della coltura con terreno fresco (scotta non pretrattata), e lasciando proseguire la coltura per altre 22 ore.

In tabella 6.27 sono riepilogate le condizioni operative adottate nella fase di fermentazione con scotta.

I parametri controllati sono stati: la temperatura a 30 ± 1 °C ed il pH a 7 ± 0.3 , aggiungendo una soluzione di NaOH 5 M (di cui sono stati consumati 43.65 l nell'arco delle 47 ore).

I parametri monitorati sono stati: la densità ottica a 620 nm, la concentrazione di biomassa e la concentrazione di lattosio in coltura (Figura 9.18).

Tabella 9.27: condizioni operative della fermentazione fed-batch con scotta Pilota 2.

Fermentazione	Pilota 2
Tipo di microrganismo	biomassa mista
Terreno	Scotta non pretrattata

Tipo di inoculo	Da espansione reattore pilota
Modalità di coltura	Fed-batch a 24 ore
Volume di lavoro	600 l
Inoculo	10 % v/v
Età inoculo	21 h
Lattosio iniziale	47 g/l
C/N iniziale	Tal quale, non corretto
Controllo di pH	7 ± 0.3 °C
Controllo di T	30 ± 1 °C
Agitazione	20 rpm (agitatore ad ancora rovesciata)
Aerazione	superficiale

Per quanto riguarda la crescita della biomassa, sia nella prima fase batch, sia nella successiva fase fed-batch non si evidenzia il raggiungimento della fase stazionaria. Dal punto di vista delle concentrazioni di biomassa ottenute, alle 24 ore della fase batch, si consegue un valore di 1.218 g/l, mentre nella successiva fase fed-batch, a 46 ore di fermentazione (22 ore dall'inoculo), viene raggiunto un valore superiore pari a 2.246 g/l.

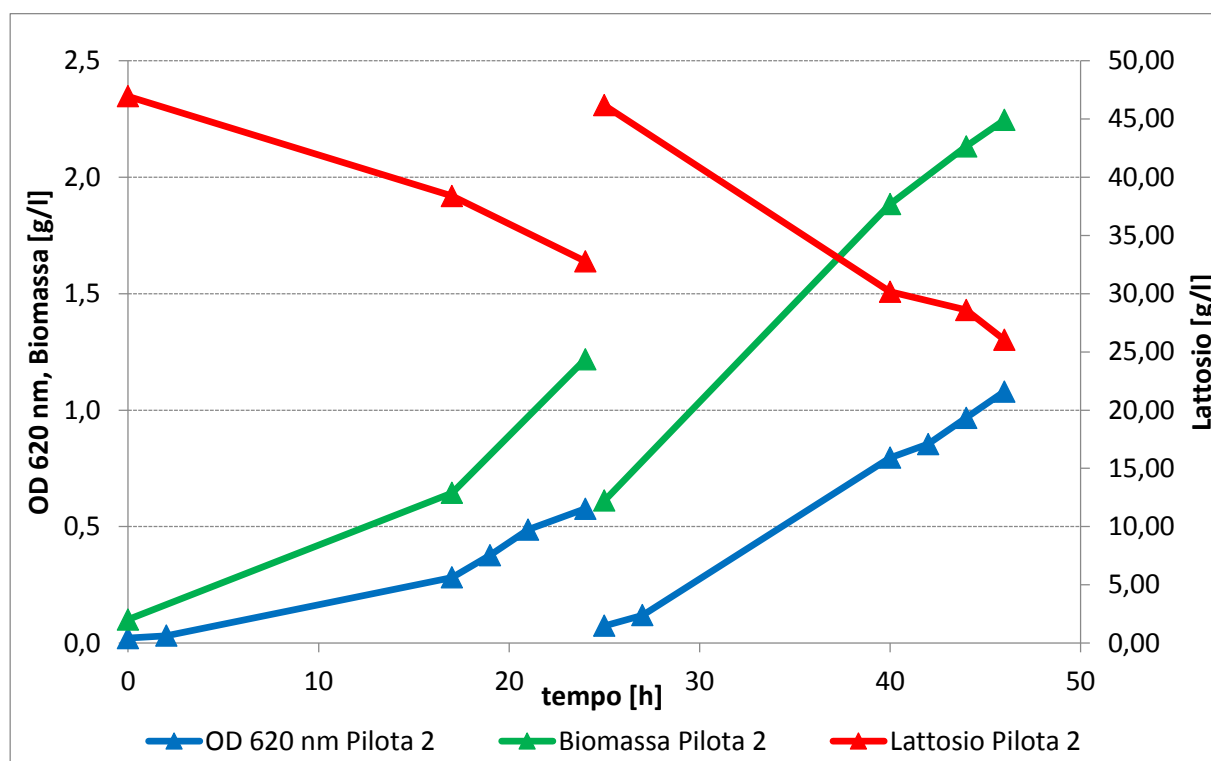


Figura 9.18: andamento di OD (620 nm), biomassa, lattosio, della fermentazione Pilota 2.

Per quanto riguarda il consumo di lattosio (Figura 9.18), al momento dell'inoculo della fase batch della coltura, la concentrazione iniziale misurata è stata di 47 g/l, mentre a 24 ore di fermentazione, la concentrazione è scesa a 33 g/l, corrispondente ad un consumo di 14 g/l. All'inizio della successiva fase fed-batch, mediante la sostituzione del 90 % del volume di coltura con scotta fresca, la concentrazione di lattosio è stata riportata a 46 g/l; al termine di questa seconda fase di coltura, corrispondente a 46 ore (22 ore dall'inoculo), la concentrazione di lattosio residuo misurata è stata pari a 26 g/l, corrispondente ad un consumo di 20 g/l.

Per quanto riguarda la resa della biomassa riferita al substrato (Tabella 9.27) è possibile osservare che il valore massimo, pari a 8.65, è raggiunto a 44 ore (19 ore dall'inoculo).

Tabella 9.27: valori di biomassa, PHA, $Y_{PHA/X}$, produttività, $Y_{X/S}$, $Y_{PHA/S}$ della fermentazione Pilota 2.

Tempo [h]	Biomassa [g/l]	$Y_{X/S}$ % [g _{biomassa} *g _{lattosio} ⁻¹]	PHA [g/l]	$Y_{PHA/X}$ % [g _{PHA} *g _{biomassa} ⁻¹]	$Y_{PHA/S}$ % [g _{PHA} *g _{lattosio} ⁻¹]	Produttività PHA [g*l ⁻¹ *h ⁻¹]
17	0.644	6.35	0.408	63.3	4.19	0.0210
24	1.218	7.89	0.850	69.8	5.65	0.0333
Fed-batch						
25	0.612	n.c.	0.403	65.8	n.c.	n.c.
40	1.884	7.95	1.324	70.3	5.76	0.0474
44	2.133	8.65	1.508	70.7	6.29	0.0471
46	2.246	8.12	1.648	73.4	6.19	0.0471

Considerando la produzione di PHA, riportata in Tabella 9.27, è possibile osservare che la massima concentrazione di polimero, pari a 1.648 g/l, è stata raggiunta durante la fase fed-batch a 46 ore (22 ore dall'inoculo), a questo tempo corrisponde anche la massima resa riferita alla biomassa pari al 73.4 %, mentre la massima resa riferita al substrato, pari al 5.76 %, è stata raggiunta a 44 ore (19 ore dall'inoculo). La massima produttività oraria raggiunta è stata pari a 0.0474 g l⁻¹ h⁻¹ registrata a 40 ore (15 ore dall'inoculo).

9.3.5 Confronto tra le fermentazioni *Pilota 1* e *Pilota 2*

In questo paragrafo viene eseguito il confronto tra le due fermentazioni condotte su scala pilota, dal punto di vista della crescita della biomassa, della produzione dei PHA e delle rese, riportate in tabella 9.28.

La concentrazione più elevata di biomassa, pari a 2.246 g/l, è stata ottenuta a 46 ore della fase fed-batch (22 ore dal fed-batch) della fermentazione *Pilota 2*, a queste condizioni corrisponde anche la seconda resa più elevata, di biomassa riferita al substrato, ottenuta in entrambe le fermentazioni, pari all'8.12 %, mentre quella massima è stata ottenuta a 44 ore (20 ore dal fed-batch), nella stessa fermentazione fed-batch, con un valore dell'8.65 %.

La concentrazione più elevata di polimero, è stata ottenuta a 46 ore (22 ore dal fed-batch) della fermentazione fed-batch e corrisponde anche alla resa riferita alla biomassa in assoluto più elevata, pari al 73.4 %. La produttività oraria più elevata, invece, è stata raggiunta a 16 ore della fermentazione *Pilota 2*, con un valore pari a 0.0474 g l⁻¹ h⁻¹.

Per quanto riguarda la resa in PHA riferita al substrato, il valore più elevato, del 6.29 % è stato ottenuto a 44 ore della fermentazione *Pilota 2* (20 ore dal fed-batch).

Considerando tutti questi risultati si può affermare che, nel caso delle fermentazioni condotte su scala pilota, ed in particolare la fermentazione *Pilota 2* con fed-batch a 24 ore, le rese e le concentrazioni di PHA ottenute sono state superiori rispetto a quelle registrate su scala di laboratorio, ed inoltre, in questo caso, la modalità di fermentazione fed-batch ha consentito di ottenere prestazioni di fermentazione migliori rispetto alla fermentazione in modalità batch.

Tabella 9.28: confronto tra le fermentazioni Pilota 1 e Pilota 2.

Tempo [h]	Biomassa [g/l]	$Y_{X/S} \%$ [g _{biomassa} *g _{lattosio} ⁻¹]	PHA [g/l]	$Y_{PHA/X} \%$ [g _{PHA} *g _{biomassa} ⁻¹]	$Y_{PHA/S} \%$ [g _{PHA} *g _{lattosio} ⁻¹]	Produttività PHA [g*l ⁻¹ *h ⁻¹]
Fermentazione Pilota 1						
14	0.68	7.08	0.36	52.6	n.c.	n.c.
24	1.82	7.86	1.04	57.1	2.68	0.0247
37	1.93	6.39	0.97	50.4	1.82	0.0142
48	2.20	5.82	0.97	43.8	1.42	0.0108
Fermentazione Pilota 2						
17	0.644	6.35	0.408	63.3	4.19	0.0210
24	1.218	7.89	0.850	69.8	5.65	0.0333
Fed-batch						
25	0.612	n.c.	0.403	65.8	n.c.	n.c.
40	1.884	7.95	1.324	70.3	5.76	0.0474
44	2.133	8.65	1.508	70.7	6.29	0.0471
46	2.246	8.12	1.648	73.4	6.19	0.0471

9.3.6 Criticità dello scale-up in impianto pilota

A seguito delle fermentazioni condotte su scala pilota sono state individuate due criticità legate alle fasi del processo, di seguito elencate:

1. Fase di carico del fermentatore con il sottoprodotto caseario.
 2. Fase di separazione della biomassa.
1. La criticità individuata in questa fase è legata alla temperatura a cui è pervenuta la scotta da impiegare nella fermentazione: il processo di produzione della ricotta, da cui deriva come sottoprodotto la scotta, prevede il raggiungimento di temperature operative prossime ai 70 °C, infatti la scotta, pervenuta alla temperatura di 65 °C è stata dosata gradualmente nel fermentatore onde evitare un innalzamento eccessivo della temperatura rispetto al valore di set-point (30 °C); questa operazione ha richiesto più di 1 ora, tempo eccessivo soprattutto nell'ottica di ulteriori scale-up. Per far fronte a questo problema, si rende necessaria una refrigerazione del sottoprodotto caseario, in maniera da abbattere i tempi della fase di carico.
 2. La criticità di questa fase è legata alla necessità di refrigerare la biomassa per inibire il fenomeno di degradazione del polimero accumulato in essa, innescato naturalmente dai microrganismi; a tale scopo si renderebbe opportuno refrigerare solamente la biomassa ottenuta dopo la separazione, onde evitare elevati costi legati alla refrigerazione dell'intera brodocoltura.

Sono stati condotti due test di separazione: un primo senza refrigerare la brodocoltura ed un secondo refrigerandola a 8 °C.

I risultati dei test hanno mostrato come la separazione della biomassa senza refrigerazione della brodocoltura non sia possibile: la biomassa, non risultando inattivata, continua la propria attività metabolica producendo CO₂ ed impedendo di conseguenza la sua separazione a causa della formazione di ingenti quantità di schiuma durante la centrifugazione. Al contrario, è stato osservato che, refrigerando la brodocoltura a 8 °C, l'attività della biomassa risulta inibita ed in

conseguenza la sua separazione risulta efficace. In queste condizioni si riesce ad ottenere un aumento della concentrazione di sostanze solide (in termini di peso di sostanze solide riferite all'unità di volume) che va dal 1÷1.5 % della brodocoltura al 75-80 % della biomassa concentrata; ne risulta un fango di consistenza pompabile, idoneo per i successivi processi di purificazione e di estrazione del polimero.

10. Analisi effettuate sui campioni di polimero estratto

10.1 Analisi FT-IR

In questo capitolo sono riportati e confrontati gli spettri ottenuti mediante l'analisi FT-IR (Fourier Transformation-InfraRed) dei campioni relativi alle fermentazioni presentate nei paragrafi 9.2 e 9.3, relativi alle fermentazioni con scotta e siero di latte.

I campioni analizzati sono stati ottenuti mediante l'estrazione 1,2 propilen-carbonato che consente di ottenere un polimero a purezza più elevata rispetto all'estrazione con la miscela ipoclorito-cloroformio.

Gli spettri sono stati comparati con quello del polimero commerciale PHB. I gruppi caratteristici del PHB sono stati segnalati con le rispettive bande nelle diverse figure. Il gruppo più significativo è quello relativo all'estere (lunghezza d'onda 1728 cm^{-1}), esso identifica i composti appartenenti alla famiglia dei poliesteri come i PHA.

Riguardo la fermentazione *Scotta CN 50*, sono stati analizzati i campioni corrispondenti al T24 (linea turchese) e T48 (linea rossa). Dalla Figura 10.1 si evince che tutti i gruppi caratteristici dei PHA sono presenti nei campioni e quindi si può affermare che il polimero ottenuto appartiene alla famiglia dei PHA. Il gruppo OH (lunghezza d'onda 3438 cm^{-1}) non è presente nel campione di riferimento ed è da attribuire al solvente residuo dell'estrazione.

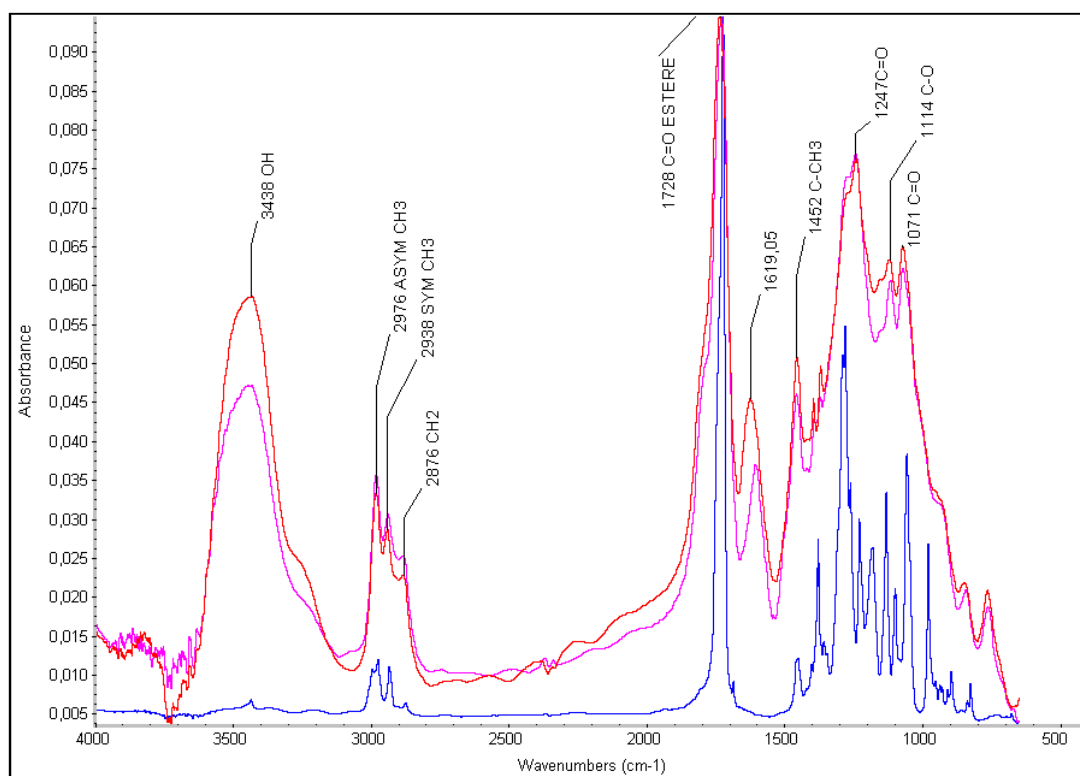


Figura 10.1: campioni della fermentazione *Scotta CN 50*: T24 (linea violetta) e T48 (linea rossa) e il campione di riferimento PHB (linea blu).

Gli spettri relativi ai campioni ottenuti dalla fermentazione *Toma CN 50* (Figura 10.2), ai tempi di fermentazione T24 e T48 mostrano come, anche in questo caso, siano presenti i picchi caratteristici

dei PHA, anche in questo caso, risulta presente il picco relativo al gruppo OH, dovuto alla presenza di solvente dell'estrazione.

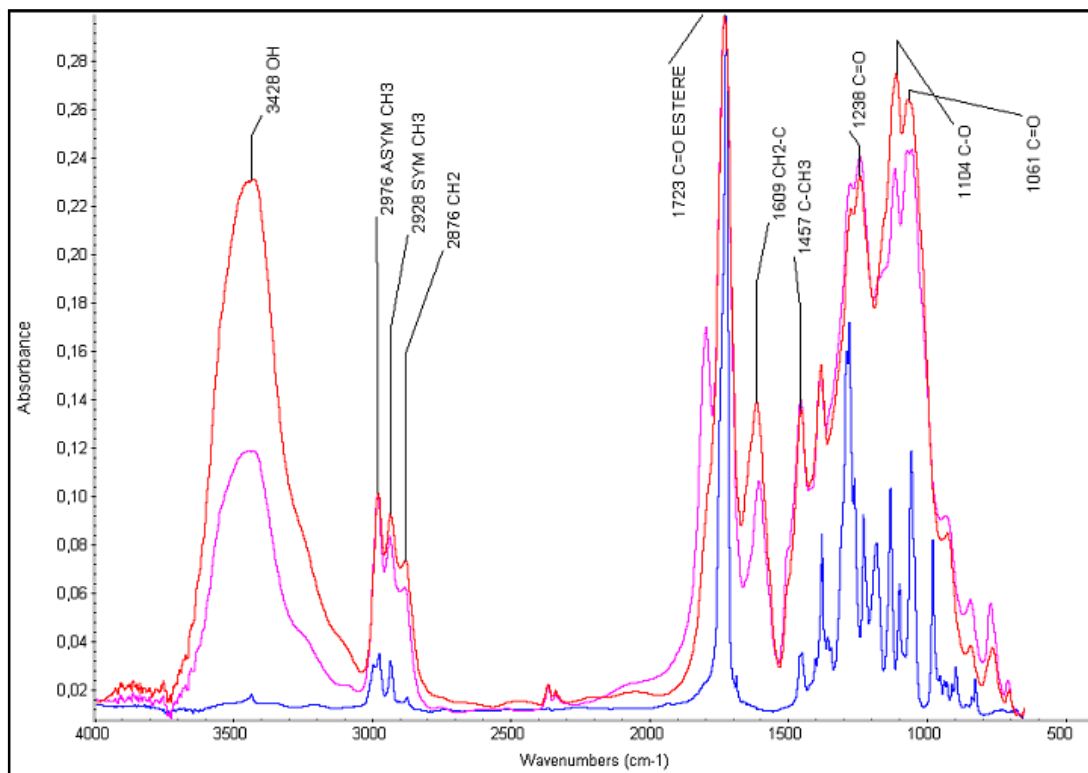


Figura 10.2: campioni della fermentazione Toma CN 50: T24 (linea rossa) e T48 (linea viola) e il campione di riferimento PHB (linea blu).

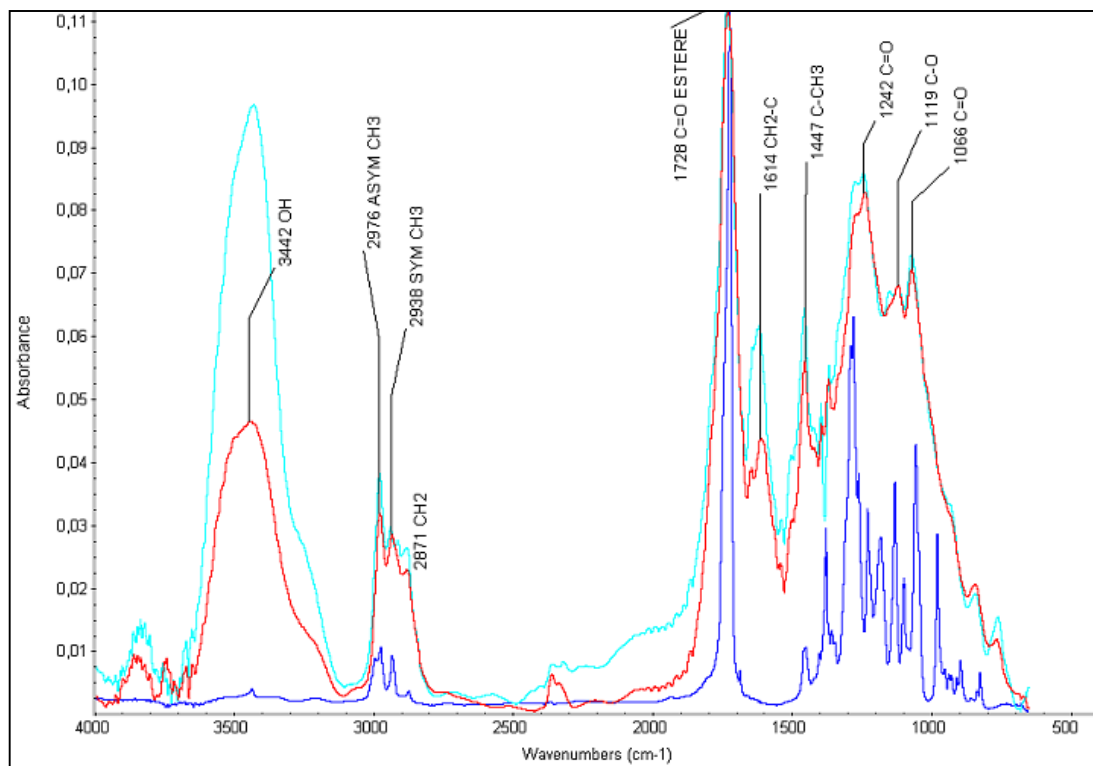


Figura 10.3: campioni della fermentazione Scotta CN TQ: T24 (linea turchese) e T48 (linea rossa) e il campione di riferimento PHB (linea blu).

Analogamente a quanto riscontrato nelle due fermentazioni *Scotta CN 50* e *Toma CN 50*, anche nella fermentazione *Scotta CN TQ* è stato sintetizzato un polimero appartenente alla famiglia dei PHA, infatti, osservando la Figura 10.3, in cui sono riportati gli spettri relativi ai campioni T24 e T48, si può notare come siano presenti tutte le bande caratteristiche dei PHA.

Per quanto riguarda le fermentazioni condotte con scotta non pretrattata, quindi la fermentazione *Scotta NT* e le due fermentazioni *Pilota 1* e *Pilota 2*, il metodo di estrazione con 1,2 propilen-carbonato è stato modificato. In questi casi, il polimero è stato ottenuto tramite precipitazione non solvente invece che tramite evaporazione del solvente. Questo cambiamento è stato deciso per consentire una maggiore purezza del polimero, tenendo conto che nel terreno di fermentazione costituito da scotta non pretrattata, sono presenti lipidi e proteine.

I campioni derivanti dalle fermentazioni sono stati confrontati, anche in questo caso, ogni volta con un campione di polimero commerciale PHB.

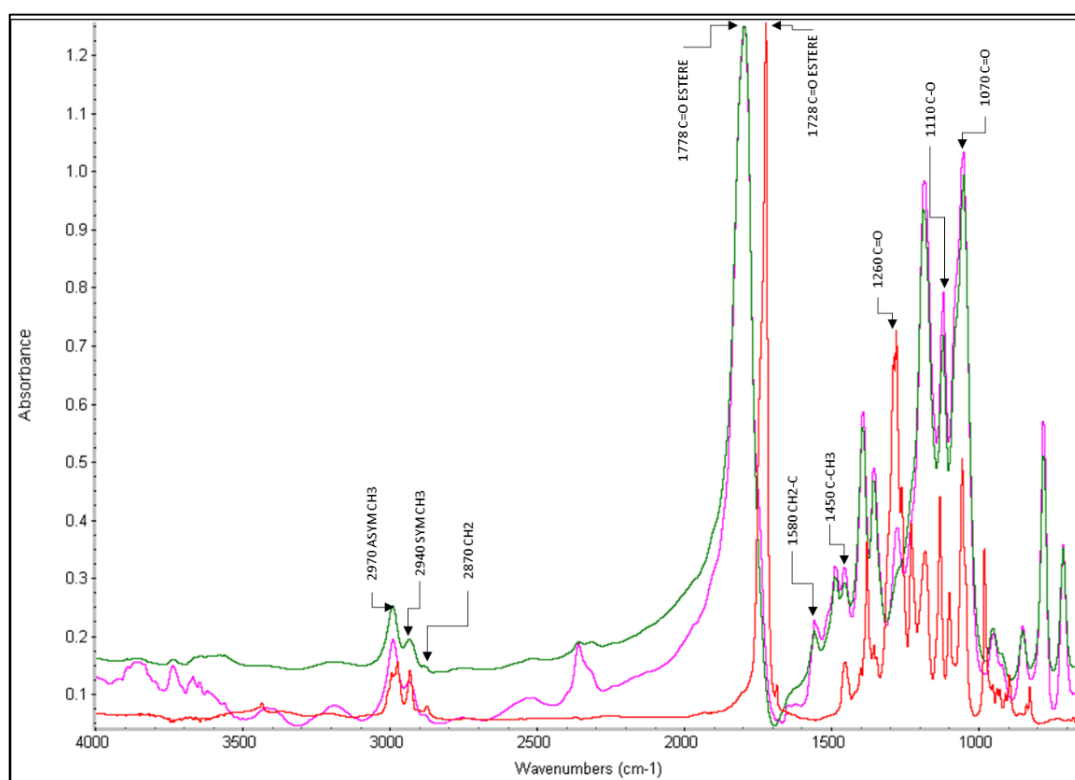


Figura 10.4: campioni della fermentazione *Scotta NT*: T24 (linea fucsia) e T48 (linea verde) e il campione di riferimento PHB (linea rossa).

I campioni derivanti dalla fermentazione *Scotta NT* analizzati corrispondono ai tempi T24 (linea fucsia) e T48 (linea verde). Dalla Figura 10.4 è possibile notare che il picco dell'estere presenta uno "shift" a lunghezza d'onda superiore (1778 cm^{-1} anziché 1728 cm^{-1}), questo fatto potrebbe essere dovuto ad impurità residue presenti ancora nel campione di polimero, dovute alla presenza di lipidi o proteine della scotta. Inoltre, nel campione ottenuto a T48, il picco corrispondente al gruppo C=O (1260 cm^{-1}) non è definito in modo chiaro. Essendo comunque presenti tutti i picchi caratteristici si può comunque affermare che il polimero ottenuto è PHA.

Per quanto riguarda la fermentazione *Scotta FB* (Figura 10.5), sono stati analizzati i campioni estratti al T24 (linea blu), T24FB1 (linea violetta) e T24FB2 (linea verde chiaro); anche in questo

caso, come nei campioni di polimero della fermentazione *Scotta NT*, è possibile notare lo “shift” del picco dell’estere a lunghezza d’onda superiore (1778 cm^{-1}) e la non chiara definizione del gruppo C=O a 1260 cm^{-1} , le motivazioni sono nuovamente da riscontrare nel fatto che la scotta impiegata in fermentazione non è stata pretrattata.

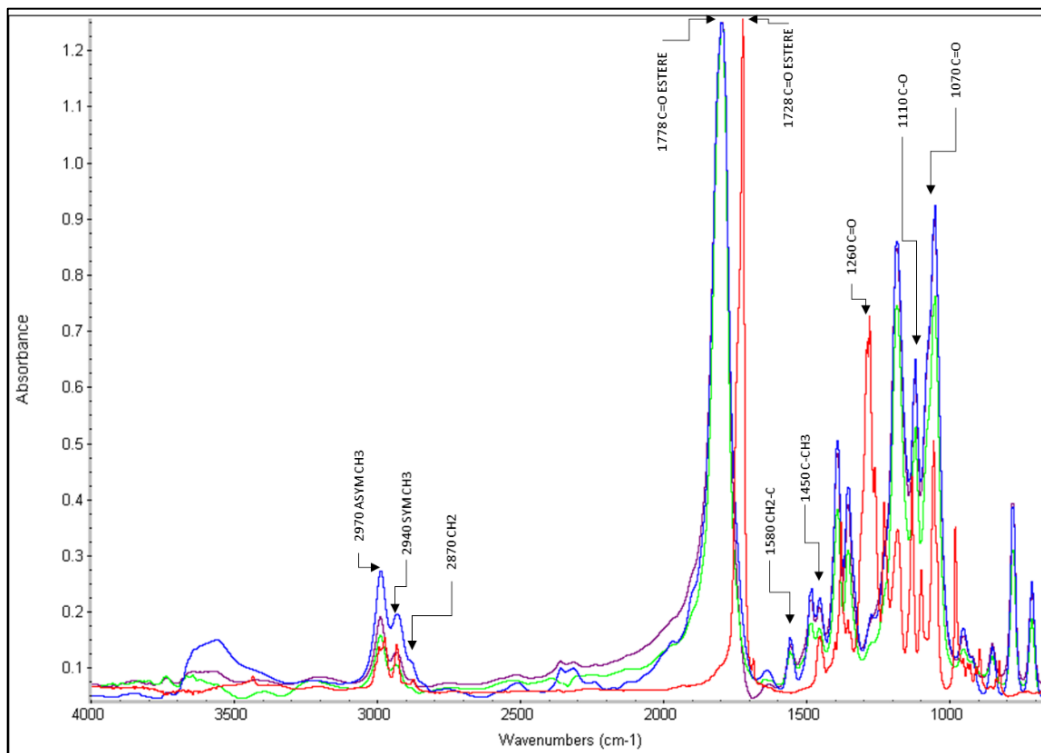


Figura 10.5: campioni della fermentazione *Scotta FB*: T24 (linea blu), T24FB1 (linea violetta), T24FB2 (linea verde chiaro) e il campione di riferimento PHB (linea rossa).

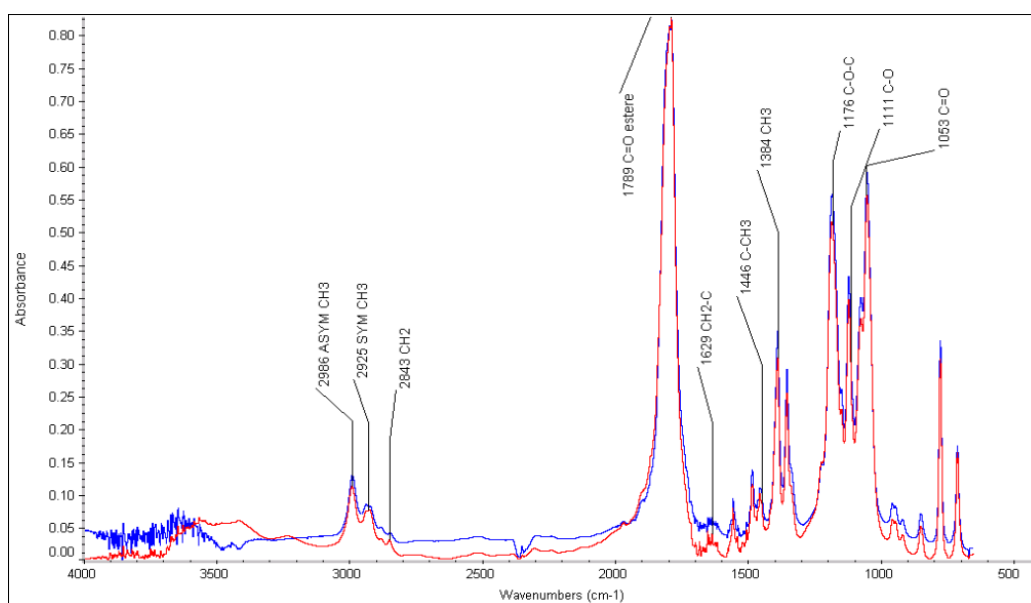


Figura 10.6: campioni spettri FT-IR dei campioni di polimero estratti a 24 ore della fermentazione *Pilota 1* (blu) ed a 47 ore della fermentazione *Pilota 2* (rosso).

Infine, nella Figura 10.6, sono riportati gli spettri dei due campioni di polimero ottenuti dalle fermentazioni su scala pilota: il primo, in blu, corrispondente ad un campione estratto durante la fermentazione *Pilota 1* a 24 ore, ed il secondo, in rosso, corrisponde ad un campione estratto a 47 ore della fermentazione *Pilota 2*. In entrambi gli spettri si evidenziano le bande caratteristiche dei PHA, in particolare lo stretching del legame C=O a 1789 e 1053 cm^{-1} , lo stretching del legame C-O a 1111 cm^{-1} del gruppo estereo, lo stretching del legame C-H a 2900, 1440 e 1360 cm^{-1} rispettivamente. Anche in questi due spettri è possibile osservare lo shift del picco dell'estere a lunghezza d'onda superiore (1789 cm^{-1}) rispetto alla stessa banda presente negli spettri del PHB (1728 cm^{-1}). Anche in questo caso è possibile affermare che il polimero ottenuto appartiene alla famiglia dei PHA.

10.2 Determinazione dei prodotti di degradazione ottenuti mediante digestione acida dei campioni di polimero

I campioni di fermentazione analizzati mediante spettrofotometria FT-IR, presentati nel paragrafo precedente, sono stati analizzati a loro volta dopo un trattamento di digestione acida in presenza di acido solforico 97 % (secondo quanto descritto in materiali e metodi paragrafo 8.12.1), mediante spettrofotometria UV ed HPLC, per la determinazione dei prodotti di degradazione. Lo stesso tipo di pretrattamento e di determinazioni sono stati effettuati su di un polimero commerciale, il PHB Sigma-Aldrich (81329).

Le analisi hanno evidenziato la presenza di acido crotonico, prodotto di degradazione del PHB in tutti i campioni di polimero analizzati.

Si può quindi affermare che nel polimero estratto, appartenente alla famiglia dei PHA, è presente il PHB.

11. Confronto con i dati di letteratura

I dati ottenuti dalle fermentazioni condotte impiegando scotta e siero di toma sono stati confrontati con quelli reperibili in letteratura, relativi a fermentazioni effettuate impiegando come terreno di coltura siero di latte, che risulta sempre pretrattato; in queste fermentazioni, l'inoculo è sempre costituito da ceppi puri.

Tabella 11.1: confronto dei dati sperimentali ottenuti con i dati di letteratura.

Microrganismi	Terreno	Tempo [h]	X [g/l]	PHA [g/l]	$Y_{PHA/X}$ [%]	Produttività PHA [g _{PHA} l ⁻¹ h ⁻¹]	Bibliografia
<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i> *	Permeato di Siero	54	6.75	2.70	40	0.05	Koller et al 2007
<i>rEscherichia coli</i> *	Siero pretrattato	20	14.50	10.33	71	0.52	Park et al 2001
<i>rEscherichia coli</i> *	Siero pretrattato	26	51	35.50	70	1.37	Park et al 2001
<i>Thermus thermophilus</i>	Siero pretrattato	24	1.60	0.57	36	0.02	Pantazaki et al 2009
<i>Methylobacterium</i> ZP24	Lattosio	48	9.90	5.90	60	0.12	Nath et al 2007
Consorzio microbico	Permeato di Scotta (CN 50)	24	2.45	0.92	37	0.04	-
Consorzio microbico	Permeato di Siero di Toma (CN 50)	24	1.17	0.43	37	0.02	-
Consorzio microbico	Permeato di Scotta (CN TQ)	29	1.36	0.50	37	0.02	-
Consorzio microbico	Scotta non pretrattata	29	1.68	0.71	42	0.02	-
Consorzio microbico scala pilota, fed-batch	Scotta non pretrattata	22 Fed-batch	2.25	1.65	73	0.05	-

Come possibile osservare in tabella 11.1, le prestazioni migliori, relative a questo lavoro, sono state ottenute dalle fermentazioni in cui sono stati utilizzati permeato di scotta e rapporto C/N iniziale corretto a 50 mediante l'aggiunta di cloruro d'ammonio (fermentazione *Scotta CN 50*) e scotta non pretrattata su scala pilota in modalità fed-batch (fermentazione *Pilota 2*).

In particolare la fermentazione *Pilota 2* ha consentito di ottenere una concentrazione, una resa ed una produttività di PHA superiori a quanto ottenuto da Pantazaki *et al.* [60] nel loro lavoro in cui è stato impiegato *Thermus thermophilus* su siero di latte pretrattato.

Considerando la produttività ottenuta dalla fermentazione *Pilota 2*, inoltre, occorre notare come questa sia confrontabile con quella raggiunta a 54 ore di fermentazione da Koller *et al.* [56] avendo impiegato permeato di siero di latte con *Hydrogenophaga pseudoflava*.

Infine, tenendo conto solamente della resa in PHA riferita alla biomassa, quella ottenuta durante la fermentazione *Pilota 2*, risulta la più elevata in assoluto.

Ottenere una resa elevata risulta importante, ma ai fini dell'economia del processo, risultano molto più importanti le voci legate alla concentrazione di polimero ed alla produttività

Occorre sottolineare quindi la bontà dei risultati ottenuti, considerando che i risultati superiori, ottenuti in altri lavori di letteratura, sono relativi all'impiego di terreni pretrattati e quindi più costosi, e ceppi puri che necessitano di operare in condizioni di sterilità, al contrario del processo sviluppato in questo lavoro, che consente maggiori economie.

12. La produzione di PHA integrata in un processo di bioraffineria

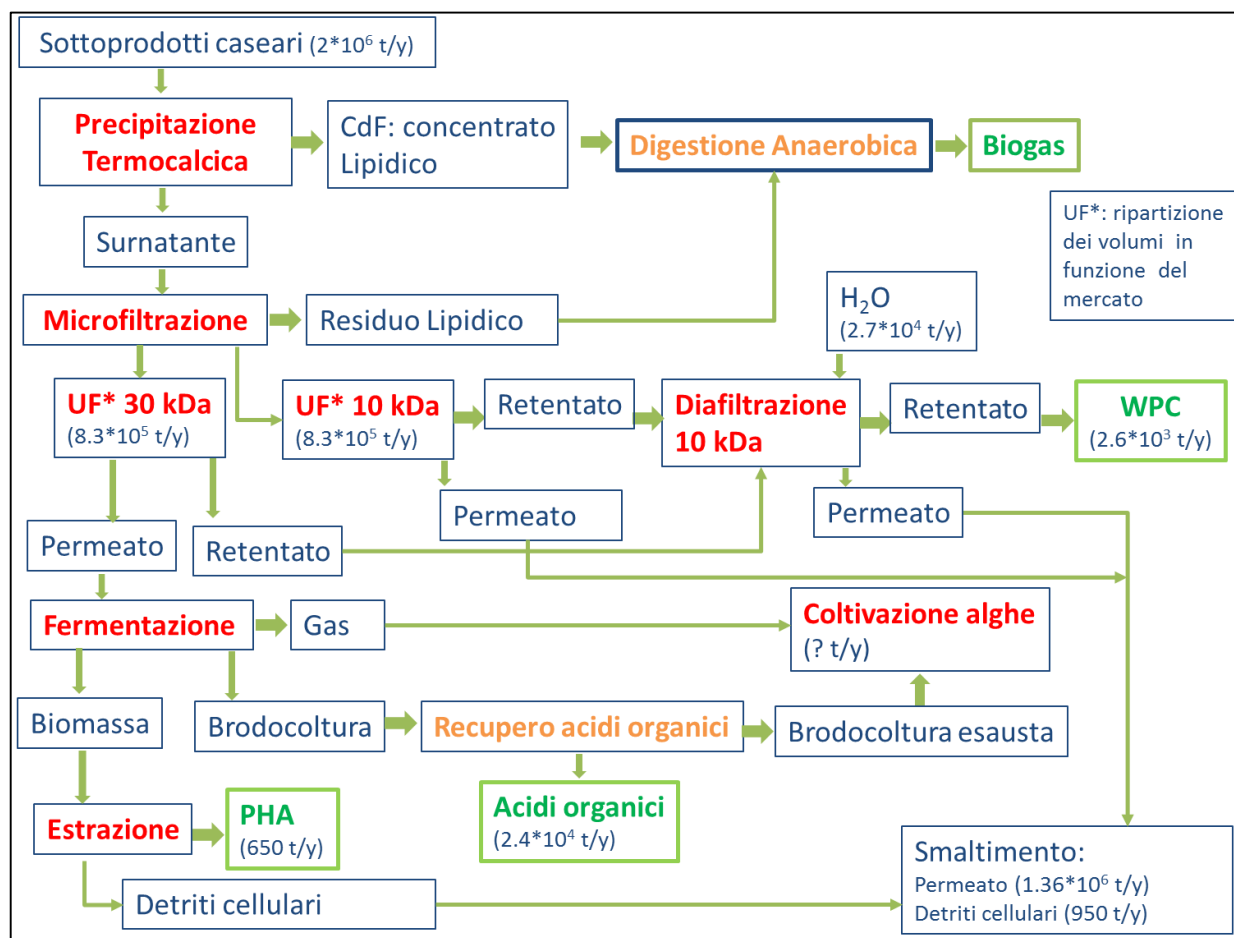


Figura 12.1: flow chart di un processo integrato per il recupero dei sottoprodotti dell'industria casearia.

In figura 12.1 è rappresentato il flow chart del un processo che ha come obiettivo la valorizzazione dei sottoprodotti caseari costituiti da siero di latte e scotta; all'interno di questo contesto si inserisce il lavoro di tesi svolto.

L'ammontare di sottoprodotti preso in considerazione è riferito alla quota parte destinata allo smaltimento, che quindi non viene riutilizzata nelle lavorazioni dell'industria alimentare.

Il processo è costituito dal pretrattamento del sottoprodotto caseario per la separazione dei lipidi, mediante precipitazione termocalcica, destinati alla digestione anaerobica e quindi alla produzione di biogas, e delle proteine, mediante ultrafiltrazione, che opportunamente purificate attraverso una diafiltrazione, sono destinate alla produzione di WPC (Whey Protein Concentrate) impiegati come integratori nell'industria alimentare.

Il permeato ottenuto dall'ultrafiltrazione è destinato alle fermentazioni per la produzione di PHA. Al termine della fermentazione, la biomassa viene separata dalla brodocoltura e destinata all'estrazione dei PHA, mentre il surnatante di fermentazione, a seguito del recupero degli acidi organici, viene utilizzato per la coltivazione di microalghe (destinate alla produzione di biodiesel o di molecole ad elevato valore aggiunto), contenendo ancora un livello di BOD consistente; i reflui gassosi della fermentazione destinati all'utilizzo per la coltura algale, fornendo a queste ultime la fonte di carbonio, costituita dalla CO₂, necessaria per la loro crescita.

In questo modo si avrebbe un processo integrato che oltre a costituire una possibile soluzione per lo smaltimento di sottoprodotti industriali, consentirebbe di ottenere un valore aggiunto derivante dalla vendita dei nuovi prodotti ottenibili: WPC, PHA, acidi organici, biogas, biodiesel.

Gli scarti di questo processo potrebbero essere a loro volta valorizzati attraverso la digestione anaerobica per produrre ulteriore biogas.

13. Conclusioni

In questo lavoro è stato studiato un processo di fermentazione, mirato alla produzione di poliidrossialcanoati (PHA). A tale scopo è stato valutato il comportamento di un consorzio microbico che fosse in grado di impiegare come terreno di crescita la scotta e siero di latte.

Inizialmente sono state effettuate prove, su scala di laboratorio, con terreno sintetico (*Khardenavis*) ed addizione di lattosio (siero di latte in polvere Molkolac®) per valutare la capacità del consorzio microbico di metabolizzare il disaccaride, in seguito il terreno sintetico è stato sostituito da scotta e siero di latte. Sono stati effettuati diversi test per determinare la necessità del pretrattamento (delipidizzazione e deproteinazione mediante precipitazione termocalcica, microfiltrazione ed ultrafiltrazione) e l'eventuale addizione di nutrienti (azoto) ai due sottoprodotti caseari.

È stato riscontrato che il consorzio microbico è in grado di crescere e produrre PHA sia con il terreno sintetico addizionato di lattosio, sia con la scotta, che con il siero di latte (derivante dalla caseificazione del formaggio toma), delipidizzati, deproteinati ed addizionati di cloruro di ammonio. La scotta pretrattata è stata utilizzata come terreno anche senza addizione di cloruro d'ammonio, fornendo risultati soddisfacenti. È stato inoltre valutato se la scotta, senza pretrattamento, possa essere idonea per la crescita del consorzio microbico e la sintesi dei PHA, i risultati ottenuti si sono dimostrati confrontabili ai precedenti. Questo tipo di terreno è stato testato con successo anche in modalità di fermentazione fed-batch.

È stato effettuato uno scale-up su impianto pilota da 600 l impiegando scotta senza pretrattamento, e testando sia la modalità di fermentazione batch, che quella fed-batch. Quest'ultimo set-up di prova ha consentito di ottenere risultati confrontabili a quelli riportati in letteratura (tab. 11.1) [56, 60].

Il polimero ottenuto dalle diverse prove è stato analizzato mediante spettrometria FT-IR e mediante valutazione dei prodotti di digestione acida; tramite queste analisi è stato confermato che tale polimero appartiene alla famiglia dei PHA e più in particolare risulta essere PHB.

Sulla base dei risultati ottenuti, è stato proposto un processo integrato di valorizzazione dei sottoprodotti dell'industria casearia, mirato alla produzione di WPC, PHA, acidi organici, biomassa algale e biogas.

Bibliografia

1. *PlasticsEurope*, “An analysis of European latest plastics production, demand and waste data”, *Plastics-the Facts* 2010.
2. *PlasticsEurope*, “An analysis of European latest plastics production, demand and waste data”, *Plastics-the Facts* 2013.
3. European Bioplastics, “Bioplastics Facts and Figures”, 2013.
4. Jung K.Y., Lee S.Y., “Efficient production of polylactic acid and its copolymers by metabolically engineered *Escherichia coli*”, *Journal of Biotechnology*, 2011, 151: 94-101.
5. Holmes P.A., “Application of PHB – a microbially produced biodegradable thermoplastic”, *Physiological Technology* 1985, 16: 32-36
6. Kosior, E., Braganca, R. M., and Fowler, P., “Lightweight compostable packaging: literature review”, *The Waste & Resource Action Program*, 2006, 26: 1–48.
7. Pessoa-Jr A., Roberto I. C., Menossi M., Santos R. R., Filho S.O., and Penna, T. C.V., “Perspectives on bioenergy and biotechnology in Brazil”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2005, 121: 59–70.
8. Shen L., Haufe J., Patel M. K., “Product overview and market projection of emerging bio-based plastics”, *PRO-BIP*, 2009, University of Utrecht, The Netherlands.
9. Chanprateep S., “Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010, 110:621-632.
10. Valera M., “Poliidrossialcanoati polimeri biodegradabili del futuro?”, *Chimica Industria*, 2001, 6: 1-7.
11. Doy Y., “Microbial polyesters”, VCH Publishers, 1990, New York, USA.
12. Sudesh K., Abe H., Doi Y., “Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters, *Progress in Polymer Science*, 2000, 25: 1503-1555.
13. Verlinden R.A.J., Hill D.J., Kenward M.A., Williams C.D., Radecka I., “Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates”, *Journal of Applied Microbiology* 2007, 102: 437–1449.
14. Jendrossek D., “Microbial degradation of polyesters: a review on extracellular poly(hydroxyalkanoic acid) depolymerases”, *Polymer Degradation and Stability*, 1998, 59: 317-325.
15. Mochizuki M., Hiramami M., “Structural Effects on the Biodegradation of Aliphatic Polyesters”, *Polymer for Advanced Technologies*, 1997, 8: 203–209.
16. Volova T.G., Boyandin A.N., Vasiliev A.D., Karpov V.A., Prudnikova S.V., Mishukova O.V., Boyarskikh U.A., Filipenko M.L., Rudnev V.P., Xuân B. B., Dũng V.V., Gitelson I.I., “Biodegradation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in tropical coastal waters and identification of PHA-degrading bacteria”, *Polymer Degradation and Stability*, 2010, 95: 2350–2359.
17. Shishatskaya E.I., Volova T.G., Puzyr A.P., Mogilnaya O.A., Efremov S.N., “Tissue response to the implantation of biodegradable polyhydroxyalkanoate sutures” *Journal of Materials Science*, 2004, 15:719-728.
18. Williams S. F., Martin D. P., “Applications of Polyhydroxyalkanoates (PHA) in Medicine and Pharmacy”. *Biopolymers Online*, 2005.

19. Shrivastav A., Kim H.Y., Kim Y.R., “Advances in the Applications of Polyhydroxyalkanoate Nanoparticles for Novel Drug Delivery System”, *BioMed Research International*, 2013, Article ID 581684, 12 p.
20. Verlinden R.A.J., Hill D.J., Kenward M.A., Williams C.D., Radecka I., “Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates”, *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102: 437–1449.
21. Chen, G.-Q. “Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications. Microbiology Monographs”, 2010, Vol. 14. Berlin, Germany: Springer.
22. Van Wegen R.J., Ling Y., Middelberg A.P.J., “Industrial production of polyhydroxyalkanoates using *Escherichia coli*: an economic analysis”, *Trans IChemE*, 1998, vol. 76, Part A.
23. Kim B.S., “Production of PHB from inexpensive substrates”, *Enzyme Microbiology and Technology*, 2000, 27: 774–777.
24. Akaraonye E., Keshavarz T., Roy I., “Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice”, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2010, 85: 732–743.
25. Chenyu D., Sabirova J., Soetaert W., Lin S.K.C., “Polyhydroxyalkanoates Production From Low-cost Sustainable Raw Materials”, *Current Chemical Biology*, 2012, 6: 14–25.
26. Van-Thuoc D., Quillaguaman J., Mamo G., Mattiasson B., “Utilization of agricultural residues for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1”, *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 104: 420–428.
27. Huang T.Y., Duan K.J., Huang S.Y. and Chen C.W., “Production of polyhydroxyalkanoates from inexpensive extruded rice bran and starch by *Haloferax mediterranei*”, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2006, 33: 701–706.
28. Albuquerque M.G.E., Eiro, M., Torres C., Nunes B.R., Reis M.A.M., “Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses”, *Journal of Biotechnology*, 2007, 130: 411–421.
29. Santimano M.C., Prabhu N.N., Garg S., “PHA production using low-cost agro-industrial wastes by *Bacillus* sp. Strain COL1/A6”, *Journal of Microbiology*, 2009, 4: 89–96.
30. Omar S., Rayes A., Eqaab A., Viss I., Steinbuechel A., “Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain”, *Biotechnology Letters*, 2011 23: 1119–1123.
31. Bhubalan K., Lee W.H., Loo C.Y., Yamamoto T., Doi Y., Sudesh K., “Controlled biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) from mixtures of palm kernel oil and 3HV-precursors”, *Polymer Degradation and Stability*, 2008, 93: 17–23.
32. Fukui T., Doi Y., “Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, 49: 333–336.
33. Ribera R.G., Monteoliva-Sanchez M., Ramos-Cormenzana A., “Production of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas putida* KT2442 harbouring pSK2665 in wastewater from olive oil mills (alpechin)”, *Journal of Biotechnology*, 2011, 4: 116–119.
34. Bengtsson S., Hallquist J., Werker A., Welander T., “Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production”, *Journal of Biochemical Engineering*, 2007, 40: 492–499.

35. Yan S., Tyagi R.D., Surampalli R.Y., "Polyhydroxyalkanoates (PHA) production using wastewater as carbon source and activated sludge as microorganisms", *Water Science and Technology*, 2006, 53: 175–180.
36. Yezza A., Fournier D., Halasz A. and Hawari J., "Production of polyhydroxyalkanoates from methanol by a new methylotrophic bacterium *Methylobacterium* sp. GW2", *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006, 73: 211–218.
37. Bourque D., Ouellette B., Andre G., Groleau D., "Production of polybeta-hydroxybutyrate from methanol: characterization of a new isolate of *Methylobacterium extorquens*", *Applied Microbiology and Biotechnology* 1992, 37: 7–12.
38. www.tecnologiepulite.it, ERVET (ultima consultazione 11/2013).
39. Faccia M., "Studio sull'entità e sulla tipologia dei reflui prodotti dall'industria lattiero-casearia in provincia di Bari", Università degli Studi di Bari, 2004.
40. ANPA, "I rifiuti del comparto agroalimentare", Studio di settore, 2001.
41. M. Pizzichini, C. Russo, E. Ferrero, E. Tuccimei, "Le tecnologie separative mediante membrana", ENEA 2009.
42. Attebery, J. M., "Removing lipid material from whey". US Pat. No. 3560219, 1968.
43. Kanno, C., Shimomura Y., Takano E., "Physicochemical properties of milk-fat emulsions stabilized with bovine milk fat globule membrane", *Journal of Food Science*, 1991, 56: 1219–1223.
44. Roesch R., Rincon R.A., Corredig. M., "Emulsifying properties of fractions prepared from commercial buttermilk by microfiltration", *Journal of Dairy Science*, 2004, 87: 4080–4087.
45. Fauquant, J., Pierre A., Brulé G., "Clarification du lactose 'rum acide de case'inerie", *La Technique Laitiere*, 1985, 1003: 37–41.
46. Fauquant, J., E. Vieco, Brulé G., Maubois J.L., "Clarification of sweet cheese whey by thermocalcic aggregation of residual fat", *Lait* 1985, 65: 1–20.
47. Maubois, J. L., Pierre A., Fauquant J., Piot m., "Industrial fractionation of main whey proteins", *Bullettin of International Dairy Federation*, 1987, 212: 154–159.
48. Pierre A., Legraet Y., Fauquant J., Piot M., Durier C., Kobilinsky A., "Optimization of physicochemical factors for whey clarification", *Lait* 1992, 72: 405–420.
49. Gésan, G., Daufin G., Merin U., Labbe J. P., Quemerais A., "Microfiltration performance—Physicochemical aspects of whey pretreatment", *Journal of Dairy Research*, 1995, 62: 269–279.
50. Lehmann H., Wasen I., "Method of dephospholipidating whey", US Pat. No. 4897279, 1990.
51. Rombaut R., Dewettinck K., "Thermocalcic Aggregation of Milk Fat Globule Membrane Fragments from Acid Buttermilk Cheese Whey" *Journal of Dairy Science* 2007, 90: 2665–2674.
52. Van Reis R., Zydney A., "Bioprocess membrane technology", *Journal of Membrane Science*, 2007, 297: 16–50.
53. Marshall A.D., Munro P.A., Trägårdh G., "The effect of protein fouling in microfiltration and ultrafiltration on permeate flux, protein retention and selectivity: A literature review", *Desalination*, 1992; 91: 65–108.
54. Specchia V., "Appunti del corso Impianti chimici I: Processi a membrana semipermeabile", Politecnico di Torino, 2011, 17–25.
55. Board P. T., "Technologies for Application and Utilization of Renewable Resources", 3° ed., Boca Raton, Dekker, 2005.
56. Koller M., Hesse P., Bona R., Kutschera C., Altic' A., Braunegg G., "Potential of Various Archae and Eubacterial Strains as Industrial Polyhydroxyalkanoate Producers from Whey", *Macromolecular Bioscience* 2007, 7: 218–226.

57. Ahn W.S., Park S.J., Lee S.Y., "Production of poly-(3hydroxybutyrate) from whey by cell recycle fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*", *Biotechnology Letters*, 2001, 23: 235–240.
58. Ahn W.S., Park S.J., Lee S.Y., "Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* using highly concentrated whey solution", *Applied Environmental Microbiology*, 2000, 66: 3624–3627.
59. Park S.J., Park J.P., Lee S.Y., "Production of poly(3hydroxybutyrate) from whey by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* in a pilot-scale fermenter", *Biotechnology Letters* 2002, 24: 185–189.
60. Pantazaki A.A., Papaneophytou C.P., Pritsa A.G., Liakopoulou-Kyriakides M., Kyriakidis D.A., "Production of polyhydroxyalkanoates from whey by *Thermus thermophilus* HB8", *Process Biochemistry* 2009, 44: 847–853.
61. Pantazaki A.A., Tambaka M.G., Langlois V., Guerin P., Kyriakidis D.A., "Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis in *Thermus thermophilus*: purification and biochemical properties of PHA synthase", *Molecular and Cellular Biochemistry* 2004, 83: 254-173.
62. Nath A., Dixit M., Bandiya A., Chavda S., Desai A.J., "Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24" *Bioresource Technology* 2008, 99: 5749–5755.
63. Yellore V.S., Ghatnekar M.S., Pai J.S., Desai A.J., "Effect of total nutrient feed on production of poly-3-hydroxybutyrate by *Methylobacterium* sp. ZP24 grown on sugar", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2000, 25: 276–279.
64. Jiang X., Ramsay J.A., Ramsay B.A., "Acetone extraction of mcl-PHA from *Pseudomonas putida* KT2440", *Journal of Microbiological Methods* 2006, 67: 212–219.
65. Jacquelin N., Chi-Wei Lo, Yu-Hong Wei, Ho-Shing Wu, Shaw S. Wang, "Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates)" *Biochemical Engineering Journal*, 2008, 39: 15–27.
66. Pouton C.W., Akhtar S., "Biosynthetic polyhydroxyalkanoates delivery and their potential in drug", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1996, 18: 133-162.
67. Hahn S.K., Chang Y.K., Kim B.S., Chang H.N., "Communication to the editor optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recovery using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform", *Biotechnology and Bioengineering* 1994, 44: 256–261.
68. Braunegg G., Lefebvre G., Genser K.F., "Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects", *Journal of Biotechnology* 1998, 65: 127–161.
69. Choi J, Lee SY, "Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals", *Biotechnology and Bioengineering* 1999, 62: 546-553.
70. Holmes, P. A., Wright, L. F., Alderson, B., Senior, P. J. "2A Process for the extraction of poly-3-hydroxy-butyric acid from microbial cells". European Patent 0015123, 1982.
71. Volova, T., Shishatskaya, E., Sevastianov, V., Efremov, S., Mogilnaya, O., "Results of biomedical investigations of PHB and PHB/PHV fibers", *Biochemical Engineering Journal* 2003, 16: 125–133.
72. Boynton, Z. L., Koon, J. J., Brennan, E. M., Clouart, J. D., "Reduction of cell lysate viscosity during processing of poly (3-hydroxyalkanoates) by chromosomal integration of

- the staphylococcal nuclease gene in *Pseudomonas putida*”, *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65: 1524–1529.
73. Teeka, J., Imai, T., Reungsang, A., Cheng, X., “Characterization of polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis by isolated *Novosphingobium* sp. THA-AIK7 using crude glycerol”, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 1999, 1–10.
 74. Khardenavis A.A., Kumar S.M., Sandeep N., Mudliar S.N., Chakrabarti T., “Biotechnological conversion of agro-industrial wastewaters into biodegradable plastic, poly β -hydroxybutyrate”, *Bioresource Technology*, 2007, 98: 3579-3584.
 75. Moisio M., Tesi di laurea specialistica: Produzione di bioplastiche da siero di latte: studio preliminare, Politecnico di Torino 2008.
 76. Zydney A. L., “Protein separation using membrane filtration: new opportunities for whey fractionation”, *International Dairy Journal*, 1998, 98: 243-250.
 77. Ercoli L., Bonari E., Barresi F., “Utilizzazione agronomica dei reflui agro-alimentari”, Pisa, ETS, 2008, 90-93.
 78. Hahn S. K., Chang Y. K., Kim B. S., Lee K. M., Chang, H. N., “Optimisation of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recovery using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform”, *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, 44: 256-261.
 79. Fiorese M. L., Freitas F., Pais J., Ramos A. M., De Araglio G. M. F., Reis M. A. M., “Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate”, *Engineering Life Science*, 2009, 6: 454-461.
 80. Law J.H., Slepecky R.A., “Assay of Poly- β -Hydroxybutyric Acid”, *Journal of Bacteriology*, 1961, 82: 33-36.
 81. Karr D.B., Waters J.K., Emerich D.W., Analysis of Poly- β -Hydroxybutyrate in *Rhizobium Japonicum* Bacteroids by Ion-Exclusion High-Pressure Liquid Chromatography and UV Detection, *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, 46: 1339-1344.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare i miei tutori, prof. Luca Marmo e prof.ssa Francesca Bosco, per avermi dato la possibilità di condurre questo lavoro sperimentale e per la grande disponibilità e cortesia dimostrati nel seguirmi; desidero ringraziare, in modo particolare, la prof.ssa Bosco per la professionalità e l'impegno profusi in questi anni attraverso il costante scambio di idee susseguitosi durante le diverse fasi delle attività sperimentali.

Desidero ringraziare la prof.ssa Enrica Pessione per la disponibilità dimostratami durante la correzione di questo elaborato.

Desidero ringraziare i responsabili dei laboratori che hanno ospitato le attività sperimentali ed analitiche collegate a questo lavoro; in particolare esprimo la mia gratitudine al prof. Franco Ferrero per il supporto teorico e pratico concessi.

Desidero inoltre ringraziare tutti coloro che hanno contribuito direttamente ed indirettamente al compimento di questo lavoro.

Ringrazio profondamente e dedico il lavoro svolto alla mia famiglia, il cui costante sostegno negli anni, ha contribuito in modo fondamentale al raggiungimento degli obiettivi che, strada facendo, ho conseguito.